

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Michael Hertl

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg



**Zelluläre Mechanismen der Toleranzinduktion unter  
spezifischer sublingualer Immuntherapie mit  
Birkenpollenallergenen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von	Karolin Ruge
aus	Weimar
Marburg	2011



Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan	Prof. Dr. Matthias Rothmund
-------	-----------------------------

Referent	PD Dr. Wolfgang Pfützner
----------	--------------------------

1. Korreferent:

# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	IV
ZUSAMMENFASSUNG	VI
SUMMARY	VIII

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ALLERGIE</b>	<b>1</b>
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Birkenpollenallergie	2
1.1.3. Allergietypen	3
1.1.3.1. Typ-I-Reaktion vom Sofort- oder anaphylaktischen Typ	3
1.1.3.2. Typ-II-Reaktion vom zytotoxischen Typ	4
1.1.3.3. Typ-III-Reaktion vom Immunkomplex-Typ	5
1.1.3.4. Typ-IV-Reaktionen vom Spättyp	5
1.1.4. Diagnostik der Typ-1-Allergie	5
1.1.5. Pathophysiologie der Typ-I-Allergie	8
1.1.6. Ätiopathogenese allergischer Erkrankungen	11
1.1.6.1. Immunabweichung zu Gunsten des T-Helfer-2-Phänotyps	11
1.1.6.2. Weitere T-Helfer-Zellpopulationen	12
<b>1.2. SPEZIFISCHE IMMUNTHERAPIE</b>	<b>13</b>
1.2.1. Sublinguale Immuntherapie	14
1.2.2. Immunregulation durch regulatorische T-Zellen	16
1.2.2.1. Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein 3	19
1.2.2.2. CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> regulatorische T-Zellen	20
1.2.2.3. Typ-1-regulatorische T-Zellen	21
1.2.2.4. T-Helfer-3-Zellen	22
1.2.3. Humorale Veränderungen unter spezifischer Immuntherapie	23
1.2.3.1. Immunglobulin E	23
1.2.3.2. Immunglobulin G	24
1.2.3.3. Immunglobulin A	25
<b>2. HYPOTHESEN UND ZIELE DER ARBEIT</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIAL</b>	<b>28</b>

3.1.	LÖSUNGEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE KULTIVIERUNG HUMANER ZELLEN	28
3.2.	ZYTOKINE UND PROTEINANTIGENE	28
3.3.	CHEMIKALIEN	28
3.4.	PUFFER UND KULTURMEDIENTEN	29
3.5.	ANTIKÖRPER FÜR DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN	30
3.6.	KOMMERZIELLE TESTS FÜR DIE SEROLOGISCHE UND ZELLULÄRE DIAGNOSTIK	31
3.7.	VERBRAUCHSMATERIALIEN	31
3.8.	GERÄTE	32
3.9.	SOFTWARE	33
<b>4.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>34</b>
4.1.	PATIENTEN	34
4.2.	EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN	34
4.3.	DURCHFÜHRUNG DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE	35
4.4.	STUDIENDESIGN	37
4.5.	KLINISCHE BEWERTUNG	38
4.5.1.	Klinischer Symptomscore	38
4.5.2.	Medikamentenverbrauch	39
4.5.3.	Pricktest	39
4.6.	IMMUNGLOBULIN E- UND IMMUNGLOBULIN G4-MESSUNG	40
4.7.	ZELLULÄRE DIAGNOSTIK	40
4.7.1.	Zellseparation mittels Dichtegradienten-Zentrifugation	40
4.7.2.	Kryokonservierung von peripheren mononukleären Zellen und Auftauprozedur	42
4.7.3.	Durchflusszytometrie	43
4.7.4.	Frequenzanalyse von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> Zellen	44
4.7.5.	Frequenzanalyse allergenspezifischer Zellen durch ELISPOT	45
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
5.1.	KLINISCHE WIRKSAMKEIT DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE	49
5.2.	FREQUENZEN BET V 1-SPEZIFISCHER T-ZELLPOPULATIONEN IM VERLAUF DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE	51

5.2.1.	Frequenzverlauf der Interleukin-5-produzierenden Zellen _____	52
5.2.2.	Frequenzverlauf der Interferon $\gamma$ -produzierenden Zellen _____	52
5.2.3.	Frequenzverlauf der Interleukin-10-produzierenden Zellen _____	53
5.2.4.	Verhältnisse einzelner T-Zellsubpopulationen _____	54
5.2.5.	Einfluss der sublingualen Immuntherapie auf die Anzahl der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> regulatorischen T-Zellen _____	56
<b>5.3.</b>	<b>HUMORALE VERÄNDERUNGEN WÄHREND DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE _____</b>	<b>57</b>
5.3.1.	Bestimmung der Immunglobulin E-Konzentration unter sublingualer Immuntherapie _____	57
5.3.2.	Bestimmung der Immunglobulin G4-Konzentration unter sublingualer Immuntherapie _____	60
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION _____</b>	<b>63</b>
<b>6.1.</b>	<b>ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEN IMMUNOLOGISCHEN PARAMETERN UND DER KLINISCHEN SYMPTOMATIK UNTER SUBLINGUALER IMMUNTHERAPIE _____</b>	<b>63</b>
<b>6.2.</b>	<b>WIRKSAMKEIT DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE _____</b>	<b>64</b>
<b>6.3.</b>	<b>EINFLUSS DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE AUF REGULATORISCHE T-ZELLEN _____</b>	<b>65</b>
6.3.1.	Typ-1-regulatorische T-Zellen im Verlauf der sublingualen Immuntherapie _____	66
6.3.2.	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> regulatorische T-Zellen _____	68
<b>6.4.</b>	<b>EINFLUSS DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE AUF T-HELPER-ZELLEN _____</b>	<b>70</b>
6.4.1.	Fehlender Anstieg der Bet v 1-spezifischen T-Helfer-2-Zellen während der Birkenpollenflugsaison unter sublingualer Immuntherapie _____	70
6.4.2.	Später Anstieg Bet v 1-spezifischer T-Helfer-1-Zellen unter sublingualer Immuntherapie _____	72
6.4.3.	Das Verhältnis von T-Helfer-2- zu T-Helfer-1-Zellen im Verlauf der sublingualen Immuntherapie _____	73
<b>6.5.</b>	<b>HUMORALE VERÄNDERUNGEN UNTER SUBLINGUALER IMMUNTHERAPIE _____</b>	<b>74</b>

6.5.1.	Initialer Anstieg des bet v 1-spezifischen Immunglobulins E während der sublingualen Immuntherapie _____	74
6.5.2.	Bet v 1-spezifisches Immunglobulin G4 _____	75
6.5.3.	Beziehung zwischen klinischer Symptomatik und Induktion von Birkenpollenallergen-spezifischen Antikörpern unter sublingualer Immuntherapie _____	78
6.6.	<b>INTERPRETATION DER VERSCHIEDENEN MECHANISMEN WÄHREND DER UNTERSCHIEDLICHEN PHASEN UNTER SUBLINGUALER IMMUNTHERAPIE _____</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS _____</b>	<b>81</b>
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG _____</b>	<b>114</b>
<b>9.</b>	<b>CURRICULUM VITAE _____</b>	<b>116</b>
<b>10.</b>	<b>ANHANG _____</b>	<b>117</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

APC	engl.: <i>antigen presenting cell</i> (antigenpräsentierende Zelle)
BPA	Birkenpollenallergen
BSA	engl.: <i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungsmuster von Zellen)
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
cpm	engl.: <i>counts per minute</i> (Zählimpulse pro Minute)
Da	Dalton
DC	engl.: <i>dendritic cell</i> (dendritische Zelle)
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
ELISPOT	engl.: <i>enzyme-linked immuno spot assay</i> (enzymgekoppelter Immunospottest)
et al.	lat.: <i>et alii</i> (und andere)
etc.	lat.: <i>et cetera</i> (und im übrigen)
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i> (fluoreszenzaktivierte Zelltrennung, Durchflusszytometrie)
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FcεR	Fc epsilon Rezeptor
FcγR	Fc gamma Rezeptor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Foxp3	engl.: <i>forkhead winged-helix transcriptional factor Box p3</i> (Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3)
FSC	engl.: <i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)



---

g	Gramm
h	Stunde(n)
HLA	engl.: <i>human leucocyte antigen</i> (humanes Leukozytenantigen)
HSM	Hausstaubmilben
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
I.R.	engl.: <i>index of reactivity</i>
iTreg	induzierbare regulatorische T-Zelle
l	Liter
m	a) milli ( $\times 10^{-3}$ ) b) Meter c) Monat
M	Molar
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
mRNA	engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
n	a) engl.: <i>number</i> (Anzahl) b) nano ( $\times 10^{-9}$ )
NK	natürliche Killerzelle
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
PBMC	engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i> (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PHS	engl.: <i>pooled human serum</i> (gemischtes Humanserum)
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
RCA	Rhinoconjunctivitis allergica
rpm	Rotationen pro Minute
SCIT	subkutane Immuntherapie
SIT	spezifische Immuntherapie

---

SLIT	sublinguale Immuntherapie
s.o.	siehe oben
sog.	so genannt(e)
SSC	engl.: <i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STAT	engl.: <i>signal transducer and activator of transcription</i> (Signalüberträger und Transkriptionsaktivator)
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TCR	engl.: <i>T cell receptor</i> (T-Zellrezeptor)
Teff	Effektor-T-Zelle
TGF	engl.: <i>transforming growth factor</i> (transformierender Wachstumsfaktor)
Th	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Treg	regulatorische T-Zelle
Tr1	Typ-1-regulatorische T-Zelle
T0	naive T-Zelle
U	eng.: <i>units</i> (Einheiten)
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
WHO	engl.: <i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
μ	mikro ( $\times 10^{-6}$ )

Englische und lateinische Bezeichnungen (z.B. Eigennamen) sind *kursiv* dargestellt.

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Typ-I-Allergie vom Soforttyp. _____	4
Abbildung 2: Entwicklung einer allergischen Reaktion. _____	10
Abbildung 3: Regulatorische T-Zellen (Treg) im Rahmen allergischer Erkrankungen. _____	17
Abbildung 4: Differenzierung von regulatorischen Zellen (Treg) im Thymus und in der Peripherie. _____	19
Abbildung 5: Dosierungsschema von Staloral300® Birke zur Einleitungsbehandlung und zur ganzjährigen Fortsetzungsbehandlung. _____	36
Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf der Blutentnahmen während der sublingualen Immuntherapie (SLIT). _____	37
Abbildung 7: Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) durch Ficoll-Dichtegradienten aus Vollblut. _____	41
Abbildung 8: Frequenzbestimmung der zytokinsezernierenden T-Zellen mittels ELISPOT-Verfahren. _____	46
Abbildung 9: Subjektive und objektive klinische Wirksamkeit der sublingualen Immuntherapie (SLIT) mit Birkenpollenallergen (BPA)-Extrakt. _____	50
Abbildung 10: Quantitative Bestimmung zytokinproduzierender Zellen mit Hilfe des enzyme-linked immuno spot assays (ELISPOT) ____	51
Abbildung 11: Frequenzverlauf Bet v 1-spezifischer T-Helfer-2-Zellen (Th2) unter sublingualer Immuntherapie (SLIT). _____	52
Abbildung 12: Frequenzverlauf Bet v 1-spezifischer T-Helfer-1-Zellen (Th) unter sublingualer Immuntherapie (SLIT). _____	53
Abbildung 13: Frequenzverlauf Bet v 1-spezifischer Interleukin (IL)-10- produzierender Zellen unter sublingualer Immuntherapie (SLIT). _____	54
Abbildung 14: Veränderungen im Verhältnis Bet v 1-spezifischer T-Helfer-2- (Th2) zu Th1 unter sublingualer Immuntherapie (SLIT). _____	55

Abbildung 15: Veränderungen im Verhältnis Bet v 1-spezifischer T-Helfer-2- (Th2) zu Typ-1-regulatorischen T- Zellen (Tr1) unter sublingualer Immuntherapie (SLIT). _____	56
Abbildung 16: Frequenzverlauf der CD4+CD25+CD127low regulatorischen T-Zellen (Treg) während der sublingualen Immuntherapie (SLIT). _____	57
Abbildung 17: Der Verlauf Birkenpollenallergen (BPA)-spezifischer Immunglobulin (Ig)E- und Bet v 1-spezifischer IgE- Antikörperkonzentrationen unter spezifischer sublingualer Immuntherapie (SLIT). _____	58
Abbildung 18: Spezifische Immunglobulin (Ig)E-Antikörperkonzentrationen unter sublingualer Immuntherapie (SLIT). _____	59
Abbildung 19: Gesamt-Immunglobulin (Ig)E-Antikörperkonzentrationen unter sublingualer Immuntherapie (SLIT). _____	60
Abbildung 20: Birkenpollenallergen (BPA)-spezifische Immunglobulin (Ig)G4-Antikörperkonzentrationen unter sublingualer Immuntherapie (SLIT). _____	61
Abbildung 21: Verhältnis zwischen Birkenpollenallergen (BPA)-spezifischen Immunglobulin (Ig)E und IgG4-Antikörpern unter sublingualer Immuntherapie (SLIT). _____	62

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beurteilung des Gesamt-Immunglobulin (Ig)E bei Erwachsenen und Interpretation des spezifischen IgE _____	7
Tabelle 2: Durchführung des ELISPOT-Verfahrens _____	47

## Zusammenfassung

Die Prävalenz allergischer Krankheiten (z.B. allergisches Asthma, allergische Rhinokonjunktivitis, Nahrungsmittelallergien und atopisches Ekzem) hat in einigen Teilen der Welt, besonders der westlichen Welt, innerhalb der letzten Jahrzehnte deutlich zugenommen. Bei einer allergischen Reaktion Typ I nach Coombs und Gell, wie allergische Rhinitis oder Asthma bronchiale, werden initial gegen harmlose Umweltantigene spezifische Immunglobulin (Ig)E-Antikörper produziert und rezeptorvermittelt an Effektorzellen, wie Mastzellen und Granulozyten, gebunden. Nach erneutem Allergenkontakt kommt es zur Quervernetzung der zellgebundenen IgE-Antikörper mit darauffolgender Zellaktivierung und Ausschüttung von Entzündungsmediatoren.

Die spezifische Immuntherapie (SIT) ist die einzige kausale Behandlungsmöglichkeit einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I und wird auf dem konventionellen Weg über subkutane Injektionen (SCIT) verabreicht. Seit Mitte der 80er Jahre wird aufgrund einfacherer Applikation, guter Effektivität und überlegender Sicherheit gegenüber der SCIT bezüglich der Gefahr eines anaphylaktischen Schocks auch vermehrt die sublinguale Darreichungsform verwendet. Um optimale Dosen, Behandlungsdauer und den richtigen Beginn der Behandlung zu ermitteln, sind weitere Studien zur Identifizierung der zellulären Mechanismen während einer sublingualen Immuntherapie (SLIT) notwendig.

In der vorliegenden longitudinalen Studie wurde das Blut von acht Birkenpollenallergikern vor und während einer zwölfmonatigen SLIT mit Birkenpollenextrakt untersucht, um zelluläre und humorale Veränderungen zu detektieren. Die fünf Entnahmezeitpunkte beinhalteten die Einleitungs- und Aufrechterhaltungsphase einschließlich einer Birkenpollenflugsaison, sodass nicht nur Auswirkungen der SLIT, sondern auch der natürlich auftretenden Allergenexposition miteinbezogen werden konnten.

Es zeigten sich über den zwölfmonatigen Therapieverlauf humorale und zelluläre Veränderungen, die zur Entwicklung einer Allergentoleranz führten. So kam es bei allen in die Studie eingeschlossenen Patienten zu einer Verbesserung der allergischen Beschwerdesymptomatik unter SLIT während der Pollenflugsaison und zur Abschwächung der Hautreaktivität gegenüber

dem Birkenpollenallergen nach einem Jahr. Entgegen Beobachtungen anderer Studien konnte in dieser Untersuchung keine Induktion allergenspezifischer Interleukin (IL)-10-produzierender Typ-1-regulatorischer T-Zellen (Tr1) oder eine Frequenzerhöhung von Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Treg) festgestellt werden. Nach sechs Monaten SLIT blieb während der Pollenflugphase der typische Anstieg allergenspezifischer T-Helfer-2-Zellen (Th2) aus, was sowohl mit einer subjektiven als auch objektiven klinischen Verbesserung der Studienteilnehmer einherging. Erst nach zwölf Monaten kam es zu einem Anstieg der Interferon(IFN)- $\gamma$ -produzierenden Th1, was eine Verschiebung der klassischen, allergischen Th2-dominanten zu einer Th1-betonten Immunantwort kennzeichnete. Eine Veränderung der humoralen Mechanismen zeigte sich nach sechs Monaten mit einem leichten Anstieg allergenspezifischer IgG4-Antikörper und einem Abfall des allergenspezifischen IgE/IgG4-Verhältnisses. Das Bet v 1-spezifische IgE sank nach einem Jahr auf Werte unter Ausgangsniveau ab.

Diese Ergebnisse stützen folgendes Modell der immunologischen Mechanismen der SLIT: Allergenspezifische, IL-10-produzierende T-Zellen bewirken in der frühen Phase der SLIT eine Erhöhung der Serumkonzentration blockierender IgG4-Antikörper. Diese könnten die IgE-mediierte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus Mastzellen und Basophilen hemmen, die IgE-vermittelte Allergenpräsentation von dendritischen Zellen (DC) gegenüber T-Zellen verhindern und die IgE-vermittelte Aktivierung eosinophiler Granulozyten blockieren. In der späten Phase der SLIT begünstigt die erhöhte Produktion von IFN- $\gamma$  durch Th1 eine Inhibition von IL-4-induzierter IgE-Produktion auf Transkriptionsebene mit Abfall des allergenspezifischen IgE und Stabilisierung der Toleranzinduktion.

Die Bestimmung der IgG4-Serumkonzentration bzw. des Verhältnisses von IgE zu IgG4 könnte somit einen Hinweis auf das Ansprechen einer Immuntherapie geben, sowie zur Verlaufskontrolle geeignet sein. Weitere SLIT-Studien sind nötig, die sich der Analyse des Wirkmechanismus sowie der Definition optimaler Kontrollparameter widmen, um die immunologischen Effekte und den dadurch erzielten klinischen Erfolg der Therapie besser zu verstehen.

---

## Summary

In some parts of the world, especially in Western industrial countries, the prevalence of allergic diseases (e.g. allergic asthma, allergic rhinoconjunctivitis, food allergy and atopic eczema) has clearly increased over the last decades. During an immediate type allergic reaction, defined by Coombs and Gell, e.g. allergic rhinitis or bronchial asthma, allergen-specific immunoglobulin (Ig)E antibodies against harmless environmental antigens are produced and are bound on effector cells, like mast cells and granulocytes.

A new allergen contact leads to a cell-activation by cross-linking of cell-bound IgE antibodies with a consecutive release of inflammatory mediators.

Specific immunotherapy (SIT) is the only causative possibility of treatment for type I hypersensitivity reactions and is conventionally administered per subcutaneous injections (SCIT). Since the middle of the eighties the usage of the sublingual dosage form of SIT has augmented because of an easier application, good efficacy and a greater safety than SCIT referring to the danger of an anaphylactic shock. To determine the optimal dose, length and appropriate beginning of treatment several studies about the identification of cellular mechanisms of sublingual immunotherapy (SLIT) are necessary.

In the current longitudinal study blood samples from eight patients with birch pollen allergy were analysed before and during twelve months of SLIT with birch pollen extract in order to detect cellular and humoral changes. The blood samples were taken at different points of time, which implied the phase of induction and maintenance including the birch pollen season, so that not only the effects of SLIT but also the naturally occurring exposition to allergen could be investigated.

During the twelve-month course of therapy humoral and cellular changes arose, which led to the development of allergenic tolerance.

In the birch pollen season all of the enrolled probands reported reduced clinical symptoms and after one year of treatment they had an attenuated skin prick test against birch pollen allergen. Contrary to observations of other studies, neither an induction of allergen-specific interleukin (IL)-10-producing type 1 regulatory T cells (Tr1) nor an elevated frequency of Foxp3<sup>+</sup> regulatory cells (Treg) could be determined in this present investigation. After six months of SLIT

there was no typical enlargement of allergen-specific T-helper-2-cells (Th2) during birch pollen season which came along with a subjective as well as an objective clinical improvement of the patients. A rise of interferon (IFN)- $\gamma$  producing Th1 after twelve month identified the shift from the classical, allergic Th2- to a Th1-dominated immune response. A change of the humoral mechanisms occurred after six month of treatment with a mild increase of allergen-specific IgG4 and decrease of the allergen-specific IgE/IgG4-ratio. After one year Bet v 1-specific IgE dropped below the initial values.

These findings support the following model of immunological mechanisms of SLIT: Allergen-specific IL-10-producing T-cells cause an elevation of the concentration of blocking IgG4 antibodies in the serum. These antibodies could inhibit the IgE-mediated release of inflammatory mediators through mast cells and basophils, could prevent the IgE-supported allergen presentation of dendritic cells (DC) to T cells and block the IgE-mediated activation of eosinophilic granulocytes. In the late period of SLIT the enhanced production of IFN- $\gamma$  through Th1 facilitates the inhibition of IL-4 induced IgE-production on the level of transcription. As a consequence allergen-specific IgE antibodies decrease and the induction of allergen tolerance is stabilized.

The measurement of IgG4 antibodies in the serum - respectively the quotient of IgE/IgG4 - might provide evidence of the response to the immunotherapy and in respect of the follow-up. More studies are required to fully analyse the mode of action and identify ideal control parameters of SLIT in order to improve the understanding about the complex, multi-factorial immunoregulatory mechanisms.



# **1. EINLEITUNG**

## **1.1. ALLERGIE**

1906 wurde der Begriff Allergie, abgeleitet vom griechischen "allos" (unterschiedlich oder verändert) und "ergos" (Arbeit, Aktion), durch den Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet beschrieben. Er bezeichnete damit eine Symptome auslösende, veränderte Reaktivität des Organismus gegenüber einem Fremdkörper, dem Allergen [Pirquet, 1906]. In dieser Definition sind sowohl verstärkte (Hyperergie), verminderte (Hypoergie) wie auch fehlende (Anergie) Reaktivitäten einbezogen. Später wird sie als spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit definiert [Ring, 1995]. Damit ist im engeren Sinne eine Krankheit gemeint, die durch eine Immunreaktion gegenüber einem ansonsten harmlosen Antigen ausgelöst wird. So wird die Allergie zu einer Klasse von Immunreaktionen gezählt, die als Hypersensibilitäts- und Überempfindlichkeitsreaktionen bezeichnet werden. Ungünstige Immunmechanismen, die zu Gewebsschäden und kritischen Erkrankungen führen können, sind dabei charakteristisch [Janeway, 2002]

Der Begriff Atopie, ein weiterer wichtiger Aspekt der Allergie, wurde 1923 von Coca und Cooke geprägt [Coca, 1923] und bezeichnet eine genetisch vererbte Disposition, bei Allergenkontakt aufgrund einer übersteigerten Immunglobulin (Ig)E-Produktion allergische Erkrankungen zu entwickeln.

### **1.1.1. EPIDEMIOLOGIE**

Ein großer Anteil der nordamerikanischen und europäischen Bevölkerung leiden unter allergischen Symptomen, ausgelöst durch Reaktionen auf weit verbreitete Umwelt- und Alltagsantigene, wie bspw. Pollen, Schimmelpilze, Tierhaare und Hausstaub [Janeway, 2002].

In den letzten 30 Jahren konnten viele epidemiologischen Studien nachweisen, dass es weltweit zu einem Anstieg allergischer Erkrankungen kam [Howarth

and Holmberg, 1995; Strachan, 1997; Ridolo, 2007; Ring, 2009]. Insgesamt sind zwischen 25% und 35% der Kinder und ungefähr 10% der Erwachsenen von allergischen Krankheiten betroffen [Aubier, 2005]. Darüber hinaus zeigen deutlich mehr Erwachsene eine positive Reaktion auf Allergene im Hauttest (54% der US-Amerikaner) und sind somit sensibilisiert [Arbes, 2005].

Allergische Erkrankungen führen neben den physischen und psychischen Einschränkungen der allergisch Erkrankten zu einer großen Belastung für die Gesundheitssysteme und stellt eine Herausforderung für die Wissenschaft dar, Ursachen für diese Zunahme zu finden, die Therapie zu verbessern und Präventionsstrategien zu entwickeln [Kurz and Riedler, 2003].

### **1.1.2. BIRKENPOLLENALLERGIE**

Die Birkenpollenallergie gehört zu den häufigsten Baumpollenallergien in Europa. In bestimmten Regionen Europas wird sogar bei 54% der Allgemeinbevölkerung ein positiver Pricktest gegen das Birkenpollenallergen (BPA) gefunden [D'Amato, 2007]. Die Blütezeit der Birke beginnt gewöhnlich Anfang März und endet im Mai [D'Amato, 2007]. Diese saisonale konstante Allergenbelastung kann für die Untersuchung zellulärer Mechanismen der allergischen Reaktion im Gegensatz zum symptomfreien Intervall außerhalb der Pollenflugsaison genutzt werden.

Das Hauptallergen der Birke (*Betula verrucosa*) ist Bet v 1 [Jarolim, 1989; Niederberger, 1998]. Bet v 1 wird als Hauptallergen bzw. Majorallergen bezeichnet, da mehr als 50% eines untersuchten Patientenkollektivs mit allergenspezifischen IgE-Antikörpern hierauf reagierten. In einer Studie von Moverare et al. zeigten sogar mehr als 98% der getesteten Birkenpollenallergiker aus Nordeuropa eine Allergie gegen Bet v 1 [Moverare, 2002].

Birkenpollenallergiker haben oft eine Kreuzallergie gegen bestimmte Nahrungsmittel, wie bspw. Kirschen, Aprikosen, Äpfel, Haselnüsse, Mandeln und Birnen, aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit ihrer Majorallergene zu Bet v 1 [Rodriguez, 2000]. Dieses Phänomen wird als orales Allergiesyndrom zusammengefasst [Anhoj, 2001].

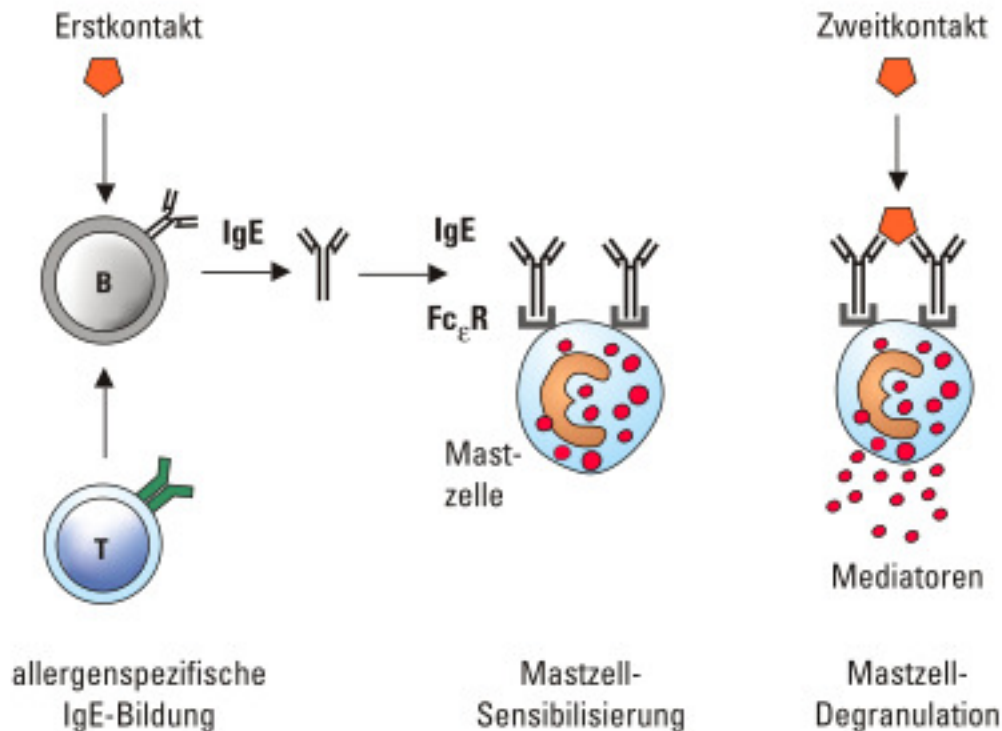
### **1.1.3. ALLERGIETYPEN**

Die Einteilung der Hypersensitivitätsreaktionen in vier Typen geht von einer Klassifikation von Coombs und Gell aus, die 1963 entwickelt wurde [Coombs, 1963].

Die Typen I-III sind durch überwiegend humoral unterhaltene Reaktionen und Typ IV durch eine primär zellulär vermittelte Immunantwort gekennzeichnet. Sie unterscheiden sich durch die beteiligten Antigene und Antikörperklassen.

#### **1.1.3.1. TYP-I-REAKTION VOM SOFORT- ODER ANAPHYLAKTISCHEN TYP**

Typ-I-Reaktionen, die häufig mit der Allergie gleichgesetzt werden, beruhen auf der Induktion einer IgE-Antikörpersynthese in der Sensibilisierungsphase, d.h. nach Erstkontakt mit dem Allergen. Ein erneuter Allergenkontakt führt zur Quervernetzung von benachbarten, auf Mastzellen oder basophilen Granulozyten gebundenen IgE-Antikörpern mit konsekutiver Freisetzung von Histamin und Entzündungsmediatoren (Proteoglykane, Proteasen, Zytokine, etc.; Abbildung1). Innerhalb weniger Minuten (min) manifestieren sich Hypersensitivitätsreaktionen wie allergische Rhinokonjunktivitis, allergisches Asthma bronchiale, Nahrungsmittel- und Insektengiftallergie, Urtikaria, Angioödem und anaphylaktischer Schock, der zu Erbrechen, Diarrhoe, Dyspnoe sowie Herz- und Kreislaufversagen führen kann. Auslöser einer Typ-I-Reaktion können neben Pollen, Nahrungsmittel, Insektengifte, Hausstaubmilben, Tierepithelien und Arzneimittel sein.



**Abbildung 1: Typ-I-Allergie vom Soforttyp.** Nach Erstkontakt mit dem Antigen kommt es zur Immunglobulin (Ig)E-Produktion durch B-Zellen (B) (Allergenspezifische IgE-Bildung). Das IgE wird an IgE-Rezeptoren ( $Fc_\epsilon R$ ) auf Mastzellen gebunden (Mastzell-Sensibilisierung) und führt bei erneutem Allergenkontakt durch Quervernetzung zur Freisetzung von Mediatoren mit konsekutiver Entzündungsreaktion (Mastzell-Degranulation) (modifiziert nach [Hahn, 2008]). (T= T-Zelle).

#### 1.1.3.2. TYP-II-REAKTION VOM ZYTOTOXISCHEN TYP

Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ II werden durch spezifische Bindung von IgM oder IgG an zell- oder gewebssassoziierte Antigene ausgelöst. Die Lyse der antigentragenden Zellen erfolgt durch Phagozyten, natürliche Killerzellen (NK) oder Aktivierung des Komplementsystems durch den Fc-Teil der gebundenen Antikörper. Antigene, die eine spezifische Antikörperbildung hervorrufen, können z.B. Medikamente, wie Antibiotika, Analgetika, Antikonvulsiva, sein, die auf der Zelloberfläche von Erythrozyten oder Thrombozyten binden und zu einer immunhämolytischen Anämie bzw. Thrombozytopenie führen. Im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, wie bspw. thrombozytopenischer Purpura, Goodpasture-Syndrom oder Pemphigus vulgaris, können ebenfalls Antikörper gegen körpereigene Antigene gebildet werden [Janeway, 2002].

### **1.1.3.3. TYP-III-REAKTION VOM IMMUNKOMPLEX-TYP**

Bei der Typ-III-Reaktion entstehen durch einen Überschuss an Antigenen kleine Aggregate von primär löslichen Antigen-Antikörper-Komplexen (IgM und IgG), die dazu neigen in das Subendothel kleiner Kapillaren einzudringen und sich in verschiedenen Organen abzulagern (z.B. Lunge, Haut, Niere und Gelenke). An solche Komplexe können Komplementfaktoren binden und eine Infiltration des Gewebes mit Makrophagen und Granulozyten herbeiführen [Janeway, 2002; Hahn, 2008].

Es werden bei diesem Typ der Immunreaktion u.a. eine systemische (Serumkrankheit) und eine lokale Form (Arthusreaktion) unterschieden. Das klinische Bild besteht aus Ödemen der Respirationsschleimhaut, Urtikaria, Albuminurie und Arthritis.

### **1.1.3.4. TYP-IV-REAKTIONEN VOM SPÄTTYP**

Die verzögerte Immunantwort der Typ-IV-Reaktion basiert auf antikörperunabhängigen zellulären Immunreaktionen. Nach erstem Allergenkontakt werden antigenspezifische T-Gedächtniszellen gebildet (Sensibilisierungsphase), die bei erneutem Antigenkontakt nach 48-72 Stunden (h) zu einer lokalen Entzündungsreaktion durch Freisetzung von Zytokinen und Gewebeeinfiltration von Monozyten und Makrophagen führen.

Klassische Beispiele für eine allergische Reaktion des Typs IV sind allergische Kontaktdermatitis, Tuberkulinreaktion, Transplantatabstoßung und zahlreiche Arzneimittelreaktionen [Janeway C. A. jr., 2002; Janeway, 2002; Moll, 2005].

### **1.1.4. DIAGNOSTIK DER TYP-1-ALLERGIE**

Die Allergiediagnostik setzt sich zusammen aus Anamnese, klinischer Untersuchung, Hauttestungen, *in vitro*-Diagnostik und Provokationstests.

Eine hohe diagnostische Aussagekraft wird dabei der Anamnese zugeordnet. Neben der Familienanamnese, die auf Allergien oder Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis hinweist, kommen die Eigenanamnese, die aktuelle Anamnese sowie bei Kindern die Fremd- oder Elternanamnese dazu.

Standardisierte Fragebögen dienen der besseren Dokumentation und Auswertung.

Allergien, deren Symptome direkt nach Allergenkontakt auftreten, lassen sich leicht diagnostizieren. Treten die Beschwerden unregelmäßig oder zeitverzögert auf bzw. liegen mehrere Allergien gleichzeitig vor, ist die Diagnosestellung schwerer. Zur Bestimmung des spezifischen Allergens gibt es verschiedene Methoden. Sie werden nach der Applikationsart des Allergens in Reib-, *Scratch*-, Prick- und Intrakutantest unterschieden.

Goldstandard und somit die am häufigsten angewandte Hauttestmethode in der Allergologie ist der Pricktest. Dabei wird das Allergen mit einer feinen Lanzette in die Haut der erscheinungsfreien Unterarminnenseiten gestochen. Bei jeder Hauttestung müssen Negativkontrollen mit physiologischer Kochsalzlösung und Positivkontrollen mit verdünnter Histaminlösung mitgeführt werden, um das Testergebnis interpretieren zu können. Nach 15 bis 20min kann der Test abgelesen werden. Bei einem positiven Testergebnis kommt es zur Quaddelbildung mit umgebenden Rötungshof [Moll, 2005]. Dabei ist darauf zu achten, dass im Vorfeld der Untersuchung eine ausreichend lange Karenzzeit antiallergischer Arzneimittel (Antihistaminika) eingehalten wird, da es sonst zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen kann [Bousquet, 1998].

Die Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper mittels herkömmlicher Immunoassay-Techniken [Stadler, 2009] kann als weiterer Diagnostikschritt bei Verdacht auf eine Allergie vom Typ I erfolgen. Ein Nachweis erhöhter Plasmaspiegel von spezifischem IgE bedeutet dabei nicht, dass eine Allergie, sondern allenfalls, dass eine Sensibilisierung gegenüber dem getesteten Allergen vorliegt. Oft wird die Höhe des IgE-Wertes in vier bis sechs Klassen unterteilt [Sanz, 1996] wobei nach einer Einteilung des Medizinischen Labors Oldenburg eine Klasse  $\geq 2$  als mäßige bis starke, Klasse 1 als schwache Reaktion und Klasse 0 als keine Reaktion bzw. nicht nachweisbare Sensibilisierung interpretiert wird (vgl. Tab.1). Ob eine klinische Relevanz (Aktualität) der Sensibilisierungen vorliegt, kann nur mit Hilfe der Anamnese und ggf. weiteren Testungen, bspw. Provokationstestungen (nasal, bronchial, oral und konjunktival), bestimmt werden.

Die Konzentration des Gesamt-IgE erlaubt es nicht, eine Sensibilisierung gegen ein bestimmtes Allergen festzustellen, sondern ist häufig bei Patienten

mit atopischen Krankheiten (allergische Rhinokonjunktivitis, exogen-allergisches Asthma bronchiale und atopisches Ekzem) erhöht. Dadurch können differenzialdiagnostisch berücksichtigte Krankheitsbilder besser abgegrenzt werden. Allerdings können auch nichtallergische Erkrankungen (wie bullöses Pemphigoid, Erythema nodosum und Verbrennungen) erhöhte Gesamt-IgE-Werte hervorrufen [Strutz, 2001]. Die Beurteilung von Gesamt-IgE und spezifischem IgE sind kurz in Tab.1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Beurteilung des Gesamt-Immunglobulin (Ig)E bei Erwachsenen und Interpretation des spezifische IgE (nach Laborfachinformationen des Medizinischen Labors Oldenburg, 01.02.2010)**

<b>Beurteilung des Gesamt-IgE bei Erwachsenen</b>		
<b>bis 20 kU/l</b>	Allergie unwahrscheinlich	
<b>20 - 100 kU/l</b>	Allergie möglich	
<b>ab 100 kU/l</b>	Allergie wahrscheinlich	

<b>Klasse</b>	<b>kU<sub>A</sub>/l</b>	<b>Interpretation des spez. IgE</b>
0	< 0,35	Keine Reaktion/nicht nachweisbare Sensibilisierung
I	0,35 - 0,69	Schwache Reaktion/Sensibilisierung
II	0,70 - 3,49	Mäßige Reaktion/Sensibilisierung
III	3,50 - 17,49	Starke Reaktion/Sensibilisierung
IV	17,50 - 52,49	Sehr starke Reaktion/ Sensibilisierung
V	52,5 - 99,99	
VI	> 100	

### 1.1.5. PATHOPHYSIOLOGIE DER TYP-I-ALLERGIE

Da sich die vorliegende Arbeit mit zellulären Mechanismen der Toleranzinduktion der Allergie vom Soforttyp beschäftigt, soll im Folgenden näher auf diese Erkrankung eingegangen werden.

Den ersten Schritt für die Entwicklung einer Soforttypreaktion stellt die Sensibilisierungsphase dar. Dabei kommt es zur Produktion von spezifischen IgE-Antikörpern gegen verbreitete für die meisten Menschen ungefährliche Antigene wie Pollen, Hausstaubmilben, Pilzsporen, tierische Epithelien und Nahrungsmittelantigene (vgl. Kap.1.2.1). In kleinen Dosen gelangen die Antigene meistens durch Diffusion über die Schleimhäute in den Körper und induzieren die Generierung von allergenspezifischen  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen (Th) [Romagnani, 2000]. Das Allergen wird dafür von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*; APC), wie dendritischen Zellen (*dendritic cells*; DC), B-Zellen bzw. Monozyten aufgenommen, denaturiert, in Peptidfragmente gespalten und über das Klasse-II-Oberflächenmolekül des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*; MHC) den T-Zell-Rezeptoren (TCR) naiver Th0 präsentiert [Hahn, 2008]. Kostimulatorische Signale durch CD28 verstärken die Interleukin (IL)-2-Sekretion, die für das Wachstum der T-Zellen und die T-Zell-Aktivierung verantwortlich ist [Gillis, 1978].

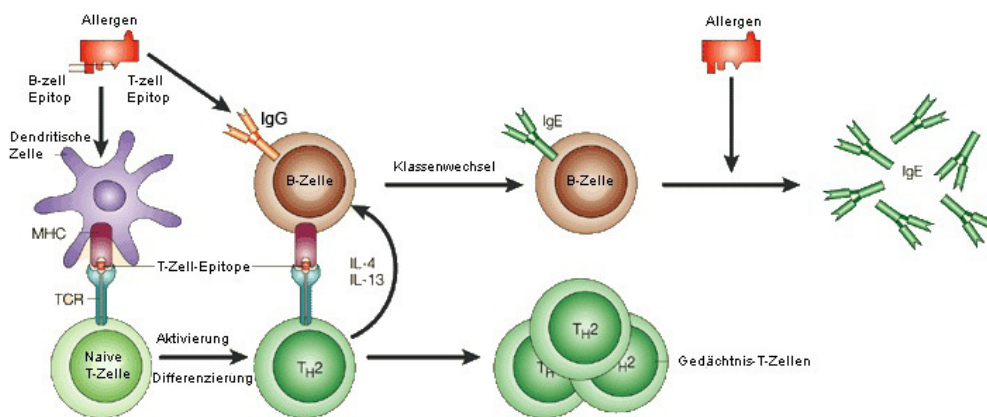
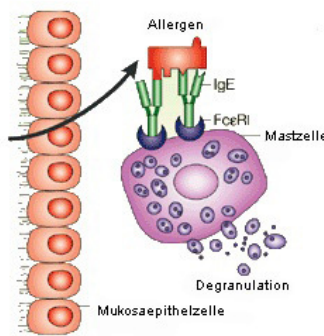
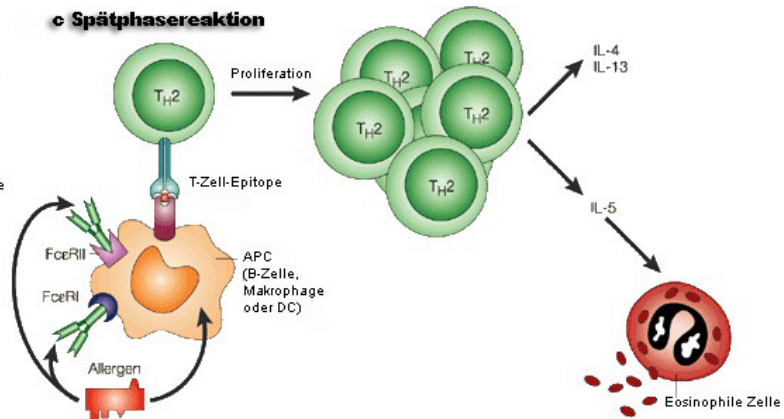
Die allergische Immunantwort führt durch einen IL-4-abhängigen Prozess zur Bildung von allergenspezifischen Th2 aus naiven T-Zellen [Romagnani, 1994; Mosmann and Sad, 1996; Rincon, 1997] (siehe Abbildung 2). Von ihnen werden wichtige Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 produziert. IL-4 und IL-13 rufen einen Klassenwechsel von IgG zu IgE hervor [Nies, 2002; Kracker and Radbruch, 2004], d.h. es kommt zur Sekretion von allergenspezifischen IgE-Antikörpern durch Plasmazellen. Des Weiteren führt IL-4 zur verstärkten MHC-II-Expression [Estes, 1995]. Die IgE-Antikörper binden anschließend an die hochaffinen IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf der Oberfläche von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten und an FcεRII auf der Oberfläche von B-Zellen [Larche, 2006].

Bei erneutem Allergenkontakt (Effektorphase) führt die Quervernetzung von IgE-Rezeptoren auf der Oberfläche von basophilen Granulozyten und



Mastzellen zur Induktion einer Signalkaskade. Es kommt zur Degranulation der Zellen mit Freisetzung von u.a. Histamin, Proteasen, Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und der Synthese von Prostaglandinen, Leukotrienen und weiteren proinflammatorischen Mediatoren [Ying, 1997; Macfarlane, 2000], die innerhalb weniger Minuten zu Dilatation der Arteriolen, erhöhter Gefäßpermeabilität, Sekretion von Schleim und Kontraktion glatter Muskeln, z.B. an den Bronchien [Hahn, 2008], führen (Frühphase der allergischen Reaktion). Begleitend werden inflammatorische Zellen wie Makrophagen, T-Zellen, Eosinophile und Basophile rekrutiert, die nach einigen Stunden eine Spätphasereaktion durch Sekretion weiterer Entzündungsmediatoren auslösen können [Elias, 2000; Larche, 2006; Bloemen, 2007]. IL-5 hat einen Einfluss auf das B-Zellwachstum und ist ein potenter Aktivator von Eosinophilen [Sehmi, 1992]. IL-4 und IL-13 sind in der Lage, die Entwicklung und Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten [Ying, 1997] und die Sekretion von Schleim und Kontraktion glatter Muskeln, z.B. an den Bronchien, zu stimulieren [Macfarlane, 2000].

Zusätzlich können andere T-Zell-Untereinheiten zur Aufrechterhaltung der allergischen Reaktion führen. Abhängig vom spezifischen Krankheitsmodell und dem Stadium der Entzündung können Th1 entweder die Effektorphase verstärken, z.B. durch Apoptoseinduktion des Epitheliums bei Asthma bronchiale oder atopischer Dermatitis [Trautmann, 2000; Basinski, 2009], oder die allergische Entzündung abschwächen [Finotto, 2002].

**a Sensibilisierung****b Sofortreaktion****c Spätphasereaktion****Abbildung 2: Entwicklung einer allergischen Reaktion.**

**a) Sensibilisierungsphase:** Nach initialem Allergenkontakt wird das Allergen von allergenpräsentierenden Zellen (APC), wie dendritischen Zellen (DC) aufgenommen und naiven T-Zellen mit Hilfe des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) präsentiert. Durch einen Interleukin (IL)-4-abhängigen Prozess kommt es zur Bildung von T-Helfer-2-Zellen (Th2), die durch die Sekretion von IL-4 und IL-13 einen Klassenwechsel von Immunglobulin (Ig) G zu IgE hervorrufen. Die IgE-Antikörper werden an hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen und an FcεRII auf B-Zellen gebunden.

**b) Sofortreaktion:** Die Quervernetzung des Effektorzell-gebundenen IgE nach erneutem Allergenkontakt führt zur Freisetzung von biologisch aktiven Stoffen, wie Histamin, durch Degranulation und anschließend zur Entstehung einer Entzündungsreaktion.

**c) Spätphasereaktion:** Durch Allergenpräsentation an T-Zellen werden diese aktiviert, proliferieren und setzen weitere Entzündungsmediatoren frei. Dieser Prozess wird wahrscheinlich durch IgE-medierte Allergenpräsentation verstärkt. Th2-Zytokine (wie IL-5) lösen Gewebs eosinophilie aus und provozieren die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren aus Eosinophilen (modifiziert nach [Valenta, 2002]). (TCR- T-Zell-Rezeptor)

### **1.1.6. ÄTIOPATHOGENESE ALLERGISCHER ERKRANKUNGEN**

Die Ätiopathogenese allergischer Erkrankungen konnte bisher noch nicht ausreichend analysiert werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren aus Umwelt und Genetik entscheidend für das Auftreten von allergischen Erkrankungen.

Dass genetische Faktoren bei der Entwicklung einer Atopie eine Rolle spielen, bringen Familienstudien, in denen ein gehäuftes Auftreten von atopischen Phänotypen und Asthma bronchiale nachgewiesen werden konnte [Wiesch, 1999], und Studien mit mono- und dizygoten Zwillingen, in denen gezeigt werden konnte, dass monozygote Zwillinge ein doppelt so hohes Risiko haben an einer allergischen Erkrankung zu leiden wie dizygote Probanden [Feijen, 2000; Los, 2001], zum Ausdruck.

Von besonderem Interesse sind modifizierbare Umweltrisikofaktoren, da sie für die Prävention und Therapie genutzt werden können. Diese wurden im Rahmen der „Hygiene-Hypothese“ beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass atopische Erkrankungen weniger häufig vorkommen 1) in Familien, die eine höhere Anzahl älterer Geschwister aufweisen [Strachan, 1989; Strachan, 1997], 2) bei Kindern, die in jungen Jahren in Kindertagesstätten untergebracht waren [Lemanske, 2002; Celedon, 2003; Hoffjan and Epplen, 2005], und 3) bei Individuen, die auf dem Land aufgewachsen sind [Riedler, 2001; Braun-Fahrlander, 2002; Wang, 2009].

#### **1.1.6.1. IMMUNABWEICHUNG ZU GUNSTEN DES T-HELPER-2-PHÄNOTYPS**

In den letzten 20 Jahren hat eine große Anzahl an Studien dazu geführt, die Hygienehypothese wieder aufzugreifen. Diese beinhaltet, dass der Ausbruch allergischer Krankheiten in westlichen Ländern das Resultat einer verminderten mikrobiellen Belastung mit einer schließlich dominierten Th2-Antwort ist [Linehan, 2007; Romagnani, 2007]. Die fehlende Stimulation durch mikrobielle Bestandteile führt zu einer verringerten Produktion von Th1-polarisierenden Zytokinen durch das angeborene Immunsystem, sodass es zu einer vermehrten Th2-Antwort und einer pathologischen Immunabweichung kommt.

*In vitro*-Studien konnten nachweisen, dass mikrobielle Komponenten oder synthetische Adjuvantien nicht nur Auswirkungen auf das angeborene Immunsystem, wie DC oder NK, haben sondern auch die Produktion von Th1-spezifischen Zytokinen IL-12, Interferon (IFN)- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  auslösen [Parronchi, 1999; Koski, 2004]. *In vivo*-Arbeiten an Mausmodellen haben demonstriert, dass die Stimulation des angeborenen Immunsystems mit mikrobiellen oder synthetischen Komponenten die Entwicklung von allergischen Erkrankungen durch Förderung der Th1-Antwort vermindert [Santeliz, 2002; Debarry, 2007]. Zudem unterstützen humane Studien die Hypothese, dass ein gestörtes Gleichgewicht zugunsten des Th2-Phänotyps als primäre Ursache für das Auftreten allergischer Inhalationskrankheiten angesehen werden kann. Kinder mit Erdnussallergie zeigen beispielsweise eine allergenspezifische Th2-dominierte Immunantwort, während Kinder ohne oder nach überstandener Allergie einen Th1-geprägten Phänotyp aufweisen [Turcanu, 2003]. Wird eine Th1-Immunantwort induziert, so kommt es über eine Stimulation der IFN- $\gamma$ -Produktion zu einer Immunmodulation. Die Differenzierung von Th2 und die IgE-Bildung werden gehemmt und dadurch eine allergische Reaktion reduziert bzw. verhindert [Kleine-Tebbe, 2006].

#### **1.1.6.2. WEITERE T-HELPER-ZELLPOPULATIONEN**

Neben den beschriebenen Populationen an T-Zellen, Th2 und Th1, spielen Th17 durch die Fähigkeit IL-17 zu sezernieren, im Rahmen der körpereigenen Abwehr gegen bestimmte Pathogene und der organspezifischen Autoimmunität eine Rolle [Burgler, 2009]. Die Differenzierung dieser Zellen erfordert die Gegenwart der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-23 und des transformierenden Wachstumsfaktors (*transforming growth factor*, TGF)- $\beta$  [Korn, 2007].

Als eine weitere wichtige Zellpopulation in Hinblick auf die Ausbildung allergischer Erkrankungen werden Th9 angesehen, deren Funktion Gegenstand aktueller Forschungsprojekte ist [Soroosh and Doherty, 2009].

## 1.2. SPEZIFISCHE IMMUNTHERAPIE

Die spezifische Immuntherapie (SIT), auch Hypo- oder Desensibilisierung genannt, ist das schrittweise Herabsetzen einer allergenspezifischen IgE-vermittelten Reaktionsbereitschaft durch regelmäßige, über einen längeren Zeitraum dauernde, Zufuhr des auslösenden Allergens in ansteigenden Konzentrationen [Moll, 2005].

Als Pioniere der SIT gelten Leonard Noon und John Freeman, die 1911 die Ergebnisse subkutaner Injektionen mit Gräserpollenextrakten bei Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis veröffentlichten [Noon, 1911]. Die grundsätzlichen Prinzipien sind bis heute bestehen geblieben. 1998 erkannte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die SIT als einzige kausale Therapieform IgE-vermittelter allergischer Erkrankungen, wie der allergischen Rhinokonjunktivitis und des allergischen Asthma bronchiale, an [Bousquet, 1998].

Eine Indikation zur SIT besteht bei Sensibilisierung gegen Soforttypallergene, wie Pollen, Hausstaubmilben, Tierhaare und Insektengift, wenn die Exposition gegenüber diesen Allergenen klinische Beschwerden verursacht und eine Karenz nicht möglich ist.

Typischerweise bekommen die Patienten bei der konventionellen subkutanen SIT (SCIT) Injektionen nach einem festen konventionellen Therapieschema verabreicht, beginnend mit einer geringen Allergendosis, die kontinuierlich gesteigert wird (Einleitungsphase) bis ein Dosisplateau erreicht ist. Zur Aufrechterhaltung wird dann in einem vier- bis sechswöchigen Abstand die Erhaltungsdosis über drei bis fünf Jahre verabreicht, um letztendlich eine immunologische Toleranz, d.h. Unempfindlichkeit gegenüber dem Allergen, herbeizuführen bzw. aufrechtzuerhalten.

Die Erfolge einer lediglich einjährigen SCIT bei der Behandlung einer allergischen Rhinokonjunktivitis sind von relativ kurzfristiger Dauer nach Beenden der Therapie [Naclerio, 1997], dagegen werden nach einer dreijährigen Therapie lang andauernde Effekte bis zwölf Jahre nach Therapieende nachgewiesen [Durham, 1999; Eng, 2006]. Eine über die Therapiedauer anhaltende Allergentoleranz entsteht durch die SCIT-induzierten

immunologischen Veränderungen (vgl. 1.8.2.) [Eng, 2002], die allerdings noch Gegenstand aktueller Forschung und nicht in jedem Detail verstanden sind.

Im Gegensatz dazu führt die medikamentöse Therapie der Typ-I-Allergie mit Antihistaminika, Leukotrienantagonisten,  $\beta_2$ -Rezeptoragonisten und Kortikosteroiden nur zu einer kurzfristigen intermittierenden Suppression der inflammatorischen Mediatoren und Immunzellen [Akdis and Akdis, 2009].

Zahlreiche kontrollierte Studien belegen die kurative Wirksamkeit und Effektivität [Walker, 1995; Varney, 1997] sowie die Sicherheit und Verträglichkeit der SCIT [Moreno, 2004]. Die SCIT beeinflusst außerdem den natürlichen Verlauf allergischer Erkrankungen, verhindert die Entwicklung eines allergischen Asthma bronchiale [Johnstone and Dutton, 1968; Grembale, 2000; Jacobsen, 2007] und das Auftreten von neuen Sensibilisierungen [Purello-D'Ambrosio, 2001; Inal, 2007]. Die SCIT verbessert weiterhin die Lebensqualität der behandelten Patienten durch Reduktion des Medikamentenverbrauchs und der Symptome [Walker, 2001].

Das am meisten gefürchtete Risiko einer SCIT ist die systemische anaphylaktische Reaktion. So wurden zwischen 1957 und 1985 dem medizinischen Sicherheitsausschuss Großbritanniens und Nordirlands 26 schwerwiegende durch SCIT ausgelöste Reaktionen gemeldet [Medicines, 1986]. Um anaphylaktische Nebenwirkungen und langjährige Behandlungszeiträume zu vermindern und die Effektivität der traditionellen SCIT zu verbessern, wurden neue Therapieverfahren wie die SIT mit chemisch modifizierten Allergenen (Allergoiden) [Wurtzen, 2007], rekombinanten Allergenen [Valenta and Niederberger, 2007] und die sublinguale Immuntherapie (SLIT) entwickelt (vgl. 1.8.1).

### **1.2.1. SUBLINGUALE IMMUNTHERAPIE**

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen die zellulären Mechanismen der Toleranzinduktion unter SLIT, weshalb der Fokus dieser Arbeit auf diese Therapieform gelegt werden soll. Für viele Jahrzehnte galt die subkutane Gabe ansteigender Allergendosen im Rahmen der konventionellen SIT als Goldstandard der SIT [Bousquet, 2001]. Seit Mitte der 1980er fand eine

alternative Applikationsart des Allergens zunehmend Beachtung bei der Behandlung von Typ-I-Allergien, die SLIT [Scadding and Brostoff, 1986], und wurde in zahlreichen von der WHO anerkannten Studien als gut verträglich und sowohl klinisch als auch immunologisch wirksam beschrieben [Pajno, 2000; Khinchi, 2004; Penagos, 2006].

Die Verbesserung klinischer Symptome einer allergischen Rhinokonjunktivitis durch Gräserpollenallergene [Clavel, 1998; Drachenberg, 2004] und eine präventive Wirkung gegenüber dem Auftreten weiterer Sensibilisierungen sowie Asthma bronchiale durch die SLIT konnte von diversen Arbeitsgruppen beobachtet werden [Di Rienzo, 2003; Novembre, 2004; Ciprandi, 2007; Pozzan and Milani, 2010]. Vergleichende Studien zwischen SCIT und SLIT dienten dazu, die wissenschaftliche Welt von der klinischen Wirksamkeit der SLIT zu überzeugen [Quirino, 1996; Khinchi, 2004]. Bezüglich der Sicherheit der Therapie, wurden unter SLIT weniger anaphylaktische Reaktionen beobachtet als unter der SCIT [Wilson, 2005; Halken, 2008; Kuo, 2009; Larenas-Linnemann, 2009]. Da die Datenlage bezüglich der gleichen Effektivität von SCIT und SLIT jedoch noch nicht eindeutig geklärt ist, sind weitere vergleichende Arbeiten als auch Langzeitstudien notwendig [Kleine-Tebbe, 2009].

Bei der SLIT wird das Allergenextrakt unter der Zunge deponiert, dabei enoral über die Schleimhaut aufgenommen, und nach wenigen Minuten entweder geschluckt oder ausgespuckt. Die kumulative Dosis des sublingual angewandten Stoffes übertrifft die des subkutan verabreichten Reagenz oft um ein Vielfaches (bis zu 100x), da oral oder sublingual verabreichte Wirkstoffe einen Aktivitätsverlust erfahren [Canonica and Passalacqua, 2003].

Die einfachere Handhabung durch eine vom Arzt unabhängige Applikation stellt einen erheblichen Fortschritt für den Patienten dar. Besonders Kinder können von der weniger invasiven und trotzdem sicheren SLIT profitieren [Valovirta, 2006; Kuo, 2009].

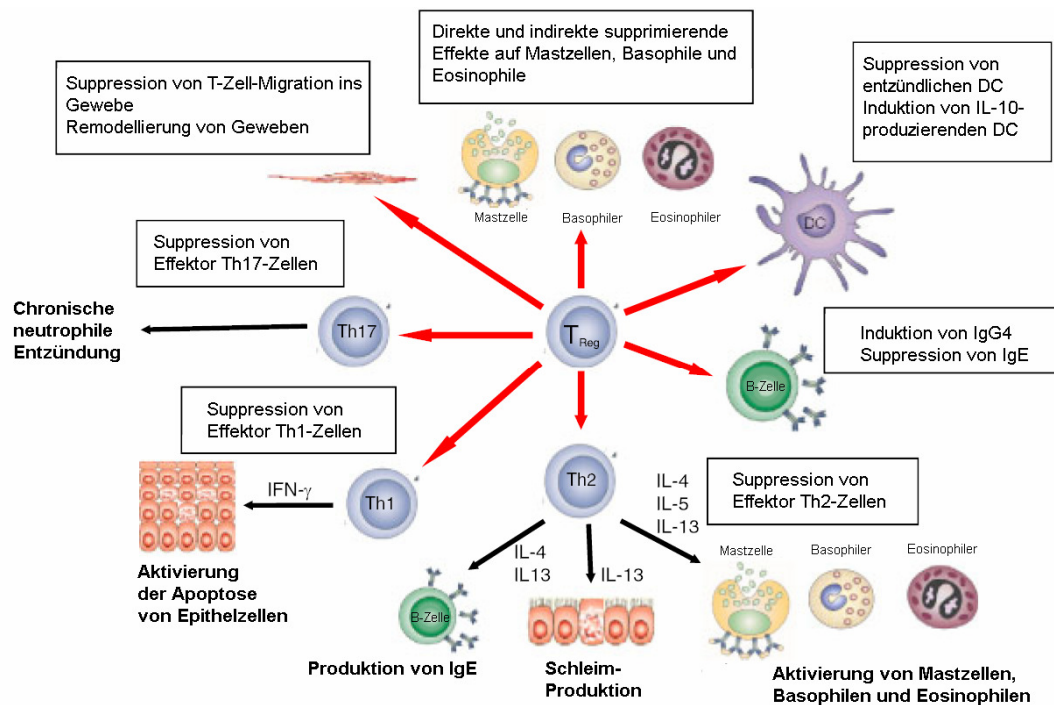
### 1.2.2. IMMUNREGULATION DURCH REGULATORISCHE T-ZELLEN

Der Effekt der Treg auf die Immunzellen und Immunglobuline resultiert in einer reduzierten allergischen Immunreaktion. Aufgrund dessen sind Treg Mittelpunkt zahlreicher Studien und stellen eine Möglichkeit zur Therapie und Prävention der Allergie dar. Unter einer SIT könnten die humoralen und zellulären Missstände der Typ-I-Allergie durch die Aktivierung und Expansion der verschiedenen Treg-Populationen korrigiert werden. Ziel ist es auf diese Weise die pathologische Verschiebung der Th-Antworten auszugleichen.

Die Idee einer inhibitorischen Funktion von T-Zellen ist fast genauso alt wie die Entdeckung der T-Zellen als eine eigene Subpopulation der Lymphozyten. Anfang der 1970er Jahre wurde die These entwickelt, dass supprimierende T-Zellen in der Lage seien, andere T-Zellen zu unterdrücken und so Immuntoleranz zu übertragen [Gershon and Kondo, 1970; Gershon and Kondo, 1971]. Zu einem der wichtigsten Forschungsschwerpunkte moderner Immunologie entwickelte sich das Feld der regulatorischen T-Zellen (Treg) durch Arbeiten von Sakaguchi et al. [Sakaguchi, 1995]. Sie beobachteten, dass die Depletion von  $CD25^{+}$ -T-Zellen, d.h.  $CD4^{+}$ -Zellen mit hoher Oberflächenexpression der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors, bei der Maus Autoimmunerkrankungen in mehreren Organsystemen hervorrief. Heute werden Treg als Zellen bezeichnet, die die Aktivität von proallergischen, proinflammatorischen T-Zellen kontrollieren bzw. supprimieren können [Schmidt-Weber and Blaser, 2006].

Vermutlich besitzen Treg die Fähigkeit die Entwicklung von allergischen Erkrankungen zu kontrollieren und zu modifizieren, indem sie die Sensibilisierung und Effektorphasen auf verschiedene Weise beeinflussen (siehe Abbildung 3).





**Abbildung 3: Regulatorische T-Zellen (Treg) im Rahmen allergischer Erkrankungen.**

Treg supprimieren allergische T-Helfer-2-Zell(Th2)-Immunantworten und führen zur Kontrolle der allergischen Erkrankungen über verschiedene Wege. Die roten Pfeile beschreiben die regulatorischen und supprimierenden Effekte, die Treg direkt und indirekt auf Effektorzellen (Mastzellen, Basophile, Eosinophile), dendritische Zellen (DC), B-Zellen, T-Effektorzellen (Th1, Th2) und Gewebe ausüben. Die schwarzen Pfeile zeigen die Wirkung der aktivierten Effektorzellen Th1, Th2, Th17 auf allergische Erkrankungen (modifiziert nach [Palomares; Palomares, 2010]). (IFN- Interferon, Ig- Immunglobulin, IL-Interleukin)

Treg schwächen die inflammatorischen Eigenschaften und die Fähigkeit der DC Th1, Th2 und Th17 zu aktivieren, indem sie die tolerogenen Phänotypen der DC fördern [Wing, 2008]. Außerdem können Treg vermutlich die Aktivierung von Th2 hemmen und dadurch die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 senken, die eine essentielle Rolle während der Effektorphase der allergischen Reaktion spielen (vgl. Kap.1.6.) [Akdis, 1998; Jutel, 2003; Akdis, 2004]. Durch direkte Beobachtungen in Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass die Kontaktzeit normaler Th und antigenbeladener DC in Anwesenheit von Tregs signifikant verkürzt ist [Tadokoro, 2006].

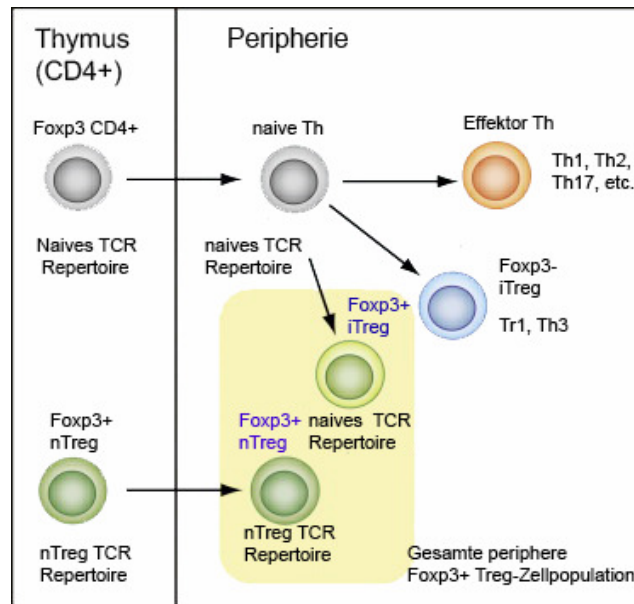
Treg scheinen außerdem in der Lage zu sein die allergische Entzündungsreaktion durch Mastzellen, Basophile und Eosinophile zu inhibieren und spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit

gewebsständigen Zellen [Gri, 2008; Nonaka, 2008]. Treg können zusätzlich das Einwandern von Effektor-T-Zellen (Teff) in das entzündete Gewebe durch zytokinabhängige Mechanismen verhindern [Ring, 2006].

Treg üben einen direkten Effekt auf B-Zellen aus, indem sie die Produktion von allergenspezifischem IgE supprimieren und IgG4 induzieren [Meiler, 2008]. Um alle diese Funktionen ausführen zu können, verfügen Treg über eine breite Auswahl an Suppressionsfaktoren, wie bspw. IL-10 und TGF- $\beta$  [Akdis, 2004; Meiler, 2008; Sakaguchi, 2009]. Beide Zytokine beeinflussen zum einen Immunantworten (vgl. Kap. 1.7.3.3) und zum anderen dienen sie der Selbstregulation der Tregs. Weitere Mechanismen zur Autoregulation von Tregs beruhen auf den Hauptfaktoren IL-2 und der Interaktion mit CD28 [Liston and Rudensky, 2007]. IL-2 induziert die Proliferation von Treg und unterstützt deren Effektivität in der Peripherie [Fontenot, 2005]. Gleichmaßen scheint die CD28-Bindung nicht nur für die Entwicklung der Treg im Thymus, sondern auch für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts der Treg in der Peripherie wichtig zu sein [Tang, 2003].

Zusammenfassend lässt sich anhand der zahlreichen experimentellen Arbeiten nachweisen, dass Treg eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von allergischen Erkrankungen spielen.

Basierend auf phänotypischen und funktionellen Markern wurden verschiedene Subpopulationen an Treg benannt. Natürlich vorkommende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg differenzieren im Thymus und wandern anschließend ins periphere Gewebe [Fontenot, 2005]. Adaptive Treg bzw. induzierbare Treg (iTreg) differenzieren in sekundären lymphatischen Organen und Geweben und entstehen infolge einer T-Zellaktivierung aus naiven CD4<sup>+</sup> Zellen [Chen, 2003]. Zu den induzierbaren Zellen gehören Foxp3<sup>+</sup> iTreg und Foxp3<sup>-</sup> iTreg. Bei letzteren handelt es sich um IL-10-sezernierende Typ-1-regulatorische Zellen (Tr1) [Roncarolo, 2006] und TGF- $\beta$ -produzierende Th3-Zellen [Weiner, 2001].



**Abbildung 4: Differenzierung von regulatorischen Zellen (Treg) im Thymus und in der Peripherie.** Die gesamte periphere Population der Forkhead-Box-Protein P3 (Foxp3)<sup>+</sup> Treg besteht aus natürlichen regulatorischen T-Zellen (nTreg), die im Thymus entstehen, und induzierbaren T-Zellen (iTreg), die in sekundären lymphatischen Organen und Geweben differenzieren. Phänotypisch sind nTreg in der Peripherie nicht von iTreg abgrenzbar. Der Unterschied liegt wahrscheinlich in ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) -Repertoire aufgrund ihrer Abstammung. Zu den Treg zählen außerdem die Foxp3<sup>-</sup> Zellen: Typ-1-regulatorische T-Zelle (Tr1) und T-Helfer-3-Zelle (Th3), die in der Peripherie induziert werden (modifiziert nach [Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009]). (CD= Differenzierungsmuster von Zellen)

### 1.2.2.1. TRANSKRIPTIONSFAKTOR FORKHEAD-BOX-PROTEIN 3

*Forkhead box protein 3* (Foxp3) ist ein nukleäres Protein, welches anscheinend die Expression von Genen negativ reguliert, die an der TCR-Signalkaskade beteiligt sind [Campbell and Ziegler, 2007]. Es fungiert einerseits als direkter transkriptioneller Repressor der Zytokinexpression, indem es DNA-Sequenzen der Promoterregion von Zytokingenen wie IL-2 bindet und die Zytokintranskription unterdrückt [Bettelli, 2005; Lopes, 2006], und andererseits wirkt Foxp3 indirekt als Inhibitor der T-Zellaktivierung durch Förderung der Expression von Signalmolekülen, die TCR-induzierte Signale inhibieren können [Carson and Ziegler, 2007].

Die Bedeutung von Foxp3 für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und der Homeostase des Immunsystems zeigen Experimente, bei denen Foxp3-mutierte oder Foxp3-defiziente Mäuse spontan ein fatales systemisches,

entzündliches, autoimmunes Syndrom und eine vermehrte IgE-Produktion, entwickelten [Brunkow, 2001; Hori, 2003; Fontenot, 2005]. Mutationen im Foxp3-Gen werden für das IPEX-Syndrom (Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-chromosomale Vererbung) verantwortlich gemacht, das durch ein weites Spektrum an Autoimmunerkrankungen, besonders Typ-1-Diabetes mellitus und entzündlichen Darmerkrankungen, gekennzeichnet ist [Bennett, 2001]. Dass durch retrovirale Transduktion von Foxp3 konventionelle CD4<sup>+</sup> T-Zellen in regulatorische Zellen mit supprimierender Aktivität umgewandelt werden können, beweist die große Bedeutung von Foxp3 bei Immuntoleranzprozessen [Fontenot, 2003; Hori, 2003; Khattri, 2003]. Obwohl es keinen direkten Beweis gibt, dass eine Allergie durch verminderte oder defekte Funktion des Foxp3 hervorgerufen wird, konnte eine Studie zeigen, dass wahrscheinlich einzelne Nukleotidpolymorphismen von Foxp3 mit der Entwicklung einer Sensibilisierung gegen Ei und Innenraumallergenen in der frühen Kindheit von Mädchen assoziiert waren [Bottema, 2009]. Weitere Studien sind nötig, um diese Hypothese zu unterstützen.

#### **1.2.2.2. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> REGULATORISCHE T-ZELLEN**

Die größte Population der Treg ist eine Untergruppe der CD4<sup>+</sup> Zellen, die auf hohem Niveau CD25 ( $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors) und Foxp3 exprimieren und als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg bezeichnet werden [Wood and Sakaguchi, 2003]. Sie umfassen 5 bis 10% aller CD4<sup>+</sup> Zellen [Hori, 2003; Khattri, 2003]. Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass der IL-7-Rezeptor (CD127) auf diesem Zelltyp herunterreguliert ist und die Kombination der Oberflächenmoleküle CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> eine geeignete Möglichkeit zur Bestimmung der Frequenz von Foxp3<sup>+</sup> Treg darstellt [Banham, 2006]. Suppressierende Eigenschaften der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Zellen wurden in Suppressionsassays nachgewiesen [Liu, 2006].

Bei Allergikern wurde eine beeinträchtigte allergenspezifische Reduktion der Foxp3<sup>+</sup> Treg im Gegensatz zu Gesunden gefunden [Thunberg, 2007]. Diese Feststellung gibt einen Hinweis auf ihre Schlüsselrolle bei der Toleranzentwicklung gegenüber nicht infektiösen Antigenen, wie Allergenen.

Die Treg supprimieren kontaktabhängig, halten die Allergentoleranz aufrecht und inhibieren Effektorzellen [Piccirillo and Shevach, 2004].

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg sind in der Lage supprimierende Aktivität auf andere CD4<sup>+</sup> Zellen zu übertragen. Dieser Vorgang wird als „infektiöse Toleranz“ bezeichnet [Jonuleit, 2002] und ist wahrscheinlich von den von Treg produzierten Zytokinen IL-10 [Dieckmann, 2002] und TGF-β [Belladonna, 2009] abhängig.

Zu den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg zählen wie erwähnt (vgl. Abbildung 4) nTreg und iTreg, die sich phänotypisch nicht voneinander unterscheiden [Sakaguchi, 2003]. nTreg entwickeln sich im Thymus in zwei aufeinander folgenden Schritten [Liston and Rudensky, 2007], die durch IL-2 gefördert werden [Fontenot, 2005; Liston and Rudensky, 2007].

In den letzten Jahren wurde erwiesen, dass Foxp3<sup>+</sup> Treg auch außerhalb des Thymus unter subimmunogener Antigenpräsentation, während chronischer Entzündungen und normaler Darmhomöostase entstehen können. Die so genannten „adaptiven“ oder „induzierten“ Foxp3<sup>+</sup> Treg sind wichtig für die Immuntoleranz der Mukosa und für die Kontrolle von schweren chronischen Entzündungen. Dabei ist darauf zu achten, dass in der Literatur „adaptiv“ ursprünglich für Foxp3<sup>-</sup> Tr1 verwendet wurde, jedoch inzwischen ausschließlich für in der Peripherie nach Allergenstimulation induzierte Foxp3<sup>+</sup> Zellen steht (vgl. Abbildung 4). Das volle Ausmaß an Unterschieden und Gemeinsamkeiten zwischen iTreg und nTreg ist jedoch noch nicht vollständig definiert [Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009].

#### **1.2.2.3. TYP-1-REGULATORISCHE T-ZELLEN**

Anhand des Zytokinsekretionsmusters wurden neben den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen noch weitere Treg definiert. Die Tr1, die nach Antigenkontakt aktiviert werden und der Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts dienen [Jonuleit, 2002].

Tr1 entwickeln sich in der Peripherie in der Gegenwart von immunsuppressiven Medikamenten, löslichen Proteinen und chronischer Stimulation mit allergischem, infektiösem oder neoplastischen Antigen aus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup> Zellen. Sie wurden erstmals bei der Klonierung von T-Zellen in Gegenwart von IL-10 isoliert [Groux, 1997] und spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle

allergischer Entzündungsreaktionen. Ihre regulatorische Funktion üben sie durch antiinflammatorische Zytokinsekretion, hauptsächlich IL-10 und TGF- $\beta$ , aus [Rouse, 2007; Wu, 2007].

IL-10 wurde ursprünglich als ein Maus-Th2-Faktor beschrieben, der die Zytokinsynthese der Th1 inhibieren konnte [Fiorentino, 1989]. Als gezeigt wurde, dass eine Neutralisation von IL-10 in antigenstimulierten peripheren mononukleären Blutzellen (engl.: *peripheral blood mononuclear cells*; PBMC)-Kulturen die Zytokinproduktion und proliferative Antworten von Th1 und Th2 wiederherstellte [Wang, 1994], kam die Vermutung einer zusätzlichen inhibitorischen Funktion von IL-10 gegenüber Th2 auf. Es konnte gezeigt werden, dass IL-10 sowohl Th1- als auch Th2-Antworten modulierte [Groux, 2001]. IL-10 unterdrückt direkt und indirekt die Aktivität von Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen [Royer, 2001; Taams, 2006] und potenziert die Synthese von IgG4-Antikörpern [Jeannin, 1998; Nouri-Aria, 2004; Akdis, 2005; Meiler, 2008].

TGF- $\beta$  interagiert mit Fibroblasten und Myofibroblasten und reduziert die peribronchiolären extrazellulären Matrixablagerungen und die Proliferation der glatten Muskulatur der Luftwege [Wu, 2007]. Die Sekretion von TGF- $\beta$  führt zur Hemmung von Th1- und Th2-fördernden Transkriptionsfaktoren [Gorelik, 2000; Gorelik, 2002], zur Stimulation der Foxp3-Expression [Marie, 2005] und der Expansion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg [Huber, 2004]. Außerdem induziert TGF- $\beta$  einen Klassenwechsel in B-Zellen in Richtung einer verstärkten Produktion von IgA [Letterio and Roberts, 1998; Cazac and Roes, 2000]. Erhöhte TGF- $\beta$ -Serumkonzentrationen und Sekretion von TGF- $\beta$ -vermitteltem IgA wurden bei Allergikern gefunden, die mit einer spezifischen Immuntherapie (SIT) behandelt wurden [Taudorf, 1992; Ariano, 1998; Jutel, 2003].

#### **1.2.2.4. T-HELPER-3-ZELLEN**

Die Th3, eine weitere Subpopulation von Foxp3<sup>+</sup> Treg, werden bei oraler Antigengabe induziert und üben ihren supprimierenden Effekt durch die Produktion von TGF- $\beta$  aus [Weiner, 2001]. Identifiziert und untersucht wurde diese Treg-Population in experimentellen Modellen der oralen Toleranz und verschiedenen humanen Autoimmunerkrankungen, wie Multipler Sklerose und

Rheumatoider Arthritis, Diabetes mellitus sowie Allergie [Faria and Weiner, 2005].

Allerdings konnte in verschiedenen Studien eine vermehrte Produktion von TGF- $\beta$  unter sublingualer Immuntherapie (SLIT) nicht beobachtet werden [Fanta, 1999; Cosmi, 2006; Bohle, 2007]. Unklar bleibt, ob es sich bei Th3 lediglich um aktivierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg [Wu, 2007] oder wie Tr1 um induzierte Treg handelt [Akdis, 2004].

### **1.2.3. HUMORALE VERÄNDERUNGEN UNTER SPEZIFISCHER IMMUNTHERAPIE**

Unter einer SIT können während konstanter exogener Allergen Zufuhr Veränderungen der Antikörperklassen IgE, IgG und IgA beobachtet werden. Diese unterschiedlichen Antikörperklassen können als Marker für die humorale Immunantwort bei einer Soforttypallergie herangezogen werden.

#### **1.2.3.1. IMMUNGLOBULIN E**

Vorraussetzung für die Entwicklung einer Allergie vom Soforttyp ist die Existenz von IgE-Fc $\epsilon$ R-Komplexen auf Mastzellen oder Basophilen und die Quervernetzung der Fc $\epsilon$ R mit nachfolgender Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren durch Allergenkontakt (vgl. Kap.1.6.).

Die IgE-Serumkonzentration ist am geringsten von allen fünf Ig-Subtypen, hat die kürzeste Halbwertszeit (ca. zwei Tage) und ist abhängig vom Alter (höchste Konzentration zwischen dem zehnten und 15. Lebensjahr, anschließender Abfall während des Erwachsenenalters), der Erbanlage, der Herkunft, dem Immunstatus und Umweltfaktoren (z.B. nach Pollenbelastung) [Smith, 2009].

Es gibt zwei Arten von IgE-Rezeptoren: Den niedrig-affinen IgE-Rezeptor (Fc $\epsilon$ RII; CD23) auf der Oberfläche von B-Zellen und anderen hämatopoetischen Zellen sowie den hoch-affinen IgE-Rezeptor (Fc $\epsilon$ RI) auf Mastzellen, Basophilen, Eosinophilen und APC [MacGlashan Jr, 2008]. Die Dichte der Expression von Fc $\epsilon$ RI und dem niedrig-affinen Fc $\epsilon$ RII (CD23) korreliert direkt mit den Serum-IgE-Spiegeln [Gomez, 2007; Tantisira, 2007].

Dadurch liegt bei erhöhtem IgE-Spiegel eine größere Dichte an IgE-Rezeptoren vor, die zu einer vermehrten Sensibilisierung und Degranulation von Entzündungsmediatoren führt.

Erhöhte IgE-Konzentrationen werden in Patienten mit atopischen Erkrankungen beobachtet [Kjellman, 1987]. Bei saisonalen Allergenen erreichen die IgE-Spiegel vier bis sechs Wochen nach dem Höhepunkt der Pollensaison ihre Höchstwerte [Stone, 2010].

Im Verlauf einer SLIT ergeben sich kontroverse Ergebnisse. Einerseits wird der Abfall allergenspezifischer IgE-Konzentrationen im Verlauf der SLIT beschrieben [Tari, 1994; Van Ree, 1997; Ozdemir, 2007], andererseits werden auch gleich bleibende, unveränderte IgE-Spiegel beobachtet [Gehlhar, 1999].

#### **1.2.3.2. IMMUNGLOBULIN G**

Die Induktion blockierender IgG-Antikörper scheint für eine erfolgreiche Immuntherapie essentiell zu sein und führte daher zu zahlreichen Analysen unter SLIT [Moingeon, 2006; Akdis and Akdis, 2007; Rossi, 2007]. IgG4-Antikörper sind in der Lage, die IgE-getriggerte entzündliche Reaktion im Rahmen einer Typ-I-Allergie zu stoppen, indem sie mit spezifischem IgE um die Bindung an Effektorzellen und an das Antigen konkurrieren. Somit wird die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus Basophilen und Mastzellen inhibiert [Garcia, 1993; Mothes, 2003]. Außerdem können blockierende Antikörper die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen verhindern, indem sie die Allergenpräsentation inhibieren [Wetterwald, 1985; van Neerven, 1999; Flicker, 2002; van Neerven, 2004; Strait, 2006].

Eine besondere Subklasse der IgG-Antikörper, IgG4, wird unter fortgeschrittener kontinuierlicher SIT produziert [Devey, 1976; Peng, 1992] und führt zu einer verminderten Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, die mit einer Reduktion an Mastzellen und Eosinophilen einhergeht [Rak, 1988; Furin, 1991; Otsuka, 1991]. Die Besonderheit von IgG4 ist, dass es kein Komplement bindet und die Immunkomplexbildung von anderen Isotypen verhindert, also antiinflammatorische Eigenschaften besitzt [Larche, 2006]. Zusätzlich können IgG4-Antikörper in Monozyten und Makrophagen die Sekretion von IL-10 induzieren [Sutterwala, 1998].



In einer doppelblinden placebokontrollierten Studie mit Hausstaubmilben (HSM)-sensibilisierten Asthmatikern konnte ein signifikanter Anstieg der IgG4-Konzentration nach einer SLIT im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden [Bousquet, 1999]. IgG4-Anstiege konnten auch von weiteren doppelblinden placebokontrollierten SLIT-Studien mit Gräserpollenextrakt bei Rhinitispatienten beobachtet werden [Clavel, 1998; Pfaar and Klimek, 2008; Tseng, 2008; Scadding, 2010].

Ausgehend von diesen Untersuchungen wird postuliert, dass erhöhte IgG4-Antikörperspiegel mit der klinischen Effektivität der SLIT einhergehen und vielleicht als ein Marker der induzierten Immuntoleranz dienen könnten [Bousquet, 1998; Wachholz and Durham, 2004]. Doch aufgrund der großen interindividuellen Variabilität der IgG4-Konzentrationen während einer SIT bei Patienten und aufgrund zahlreicher Studien, die zeigen, dass die IgG4-Konzentrationen nicht immer mit der klinischen Symptomatik übereinstimmen [Bodtger, 2005], werden Antigen-IgG4-Komplexe als Marker für den klinischen Erfolg kontrovers diskutiert.

#### **1.2.3.3. IMMUNGLOBULIN A**

IgA, der vorherrschende Antikörperisotyp in mukosalen Geweben und Sekreten [Pilette, 2004; Woof and Mestecky, 2005], führt zu einem ersten Abwehrmechanismus durch Neutralisierung inhalierter oder aufgenommener Antigene. Durch Regulation der Entzündungsmediatorfreisetzung kann die inflammatorische Antwort auf Ebene der mukosalen Oberflächen inhibiert werden [Wolf, 1994]. Pionierarbeiten wiesen bereits darauf hin, dass die Produktion von IgA mit oraler Toleranz verbunden [Challacombe and Tomasi, 1980] und ein transienter IgA-Mangel ein Risikofaktor für eine IgE-Sensibilisierung im frühen Lebensalter sein könnte [Taylor, 1973]. Unter erfolgreicher SIT werden erhöhte IgA-Konzentrationen beobachtet [Jutel, 2003]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IgA in Monozyten eine IL-10-Produktion induzieren kann und mit der Produktion von lokalem TGF- $\beta$  einhergeht [Pilette, 2007].

Ähnlich dem Antikörper IgG4 werden IgA antientzündliche Eigenschaften zugeordnet, da sie Makrophagen und Monozyten inhibieren können und das

Komplementsystem nur gering aktivieren [Wolf, 1994]. Das inhibitorische Zytokin TGF- $\beta$  scheint am bedeutsamsten für den Klassenwechsel der B-Zellen zur Produktion von IgA verantwortlich [Schmidt-Weber and Blaser, 2004] zu sein und konnte in PBMC nach einer SIT nachgewiesen werden [Jutel, 2003].

## **2. HYPOTHESEN UND ZIELE DER ARBEIT**

Die vorliegende Arbeit soll folgende Hypothesen überprüfen:

- 1.) Während einer SLIT gegen Birkenpollen kommt es zu einer allergenspezifischen Toleranzinduktion, die durch Tregs und modifizierte Th-Untereinheiten sowie damit verbundenen humoralen Veränderungen vermittelt wird.**

Durch Bestimmung der  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  Treg mittels Durchflusszytometrie und der Bet v 1-spezifischen Tr1, Th1 und Th2 über deren repräsentative Zytokinproduktion mit Hilfe des ELISPOT-Verfahrens wurden zelluläre Frequenzveränderungen unter SLIT erfasst. Humorale Unterschiede wurden durch Bestimmung der Antikörperkonzentrationen (Gesamt-IgE, spezifisches IgE und IgG4) über den Verlauf der SLIT gemessen.

Die Daten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten vor Beginn und während der SLIT (M0, M1, M3, M6, M12) erhoben und mit den klinischen Ergebnissen (Symptomscores und Pricktestreaktivität) verglichen.

- 2.) Die Verbesserung der klinischen Symptome beruht auf der parallelen Induktion von Tr1 und allergenspezifischen IgG4-Antikörpern.**

Durch Bestimmung der IL-10-sezernierenden T-Zellen und Analyse der IgG4-Konzentrationen über den Therapieverlauf der SLIT wurde diese Hypothese untersucht.

- 3.) Die SLIT induziert eine mit der SCIT vergleichbare Immunantwort.**

Diese Studie wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Untersuchung immunologischer Parameter bei einer Kohorte von Birkenpollenallergikern unter konventioneller SCIT von Möbs et al. an der Klinik für Dermatologie und Allergologie durchgeführt [Möbs, 2010b] und soll die Daten zwischen den zellulären und humoralen Veränderungen induziert durch SCIT und SLIT vergleichend analysieren.

### 3. MATERIAL

#### 3.1. LÖSUNGEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE KULTIVIERUNG HUMANER ZELLEN

Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Humanes Serum (PHS), Typ AB	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
L-Glutamin 200mM mit Penicillin(10.000U/ml)/Streptomycin(10.000µg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamin	Lonza, Vervies, Belgien

#### 3.2. ZYTOKINE UND PROTEINANTIGENE

Interleukin-2 (IL-2), human	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Interleukin-7 (IL-7), human	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Interleukin-10 (IL-10), human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Rekombinantes Bet v 1	Biomay, Wien, Österreich
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

#### 3.3. CHEMIKALIEN

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC; C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Dimethylsulfoxid (DMSO; C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

Dulbecco's PBS 1x (ohne $\text{Ca}^{2+}$ + $\text{Mg}^{2+}$ )	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Essigsäure ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA; $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
FACSClean	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACSFlow	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACSRinse	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ )	Merck KGaA, Darmstadt
[methyl- $^3\text{H}$ ]-Thymin	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Natrumacetat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck KGaA, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid (DMF; $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Pancoll, human	PAN-Biotec GmbH, Aidenbach
Paraformaldehyd (PFA; $(\text{CH}_2\text{O})_n$ )	Merck KGaA, Darmstadt
2-Propanol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Rinderalbumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH+ Co. KG, Karlsruhe
Szintillationslösung MicroScint <sup>TM</sup> -0	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jugesheim
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Tween <sup>®</sup> 20	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30% ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Merck KGaA, Darmstadt

### 3.4. PUFFER UND KULTURMEDIENTEN

Puffer/Medium	Zusammensetzung
ACK-Lysis-Puffer	0,15M $\text{NH}_4\text{Cl}$ +1mM $\text{KHCO}_3$

	+0,1mM EDTA → auf 1l ddH <sub>2</sub> O → pH 7,2-7,4 einstellen
FACS-Puffer	Dulbecco's PBS 1x +1% BSA +0,1% NaN <sub>3</sub> → sterile Filtration mittels Stericup 0,22µm (Milipore) → Lagerung bei 4°C
Einfriermedium	FCS +10% DMSO
RPMI <sup>++</sup>	RPMI 1640 +100U/ml Penicillin +100µg/ml Streptomycin +2mM L-Glutamin

### 3.5. ANTIKÖRPER FÜR DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN

Spezifität	Isotyp	Konjugat	
CD4	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD25	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD127	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Iso-K	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Iso-K	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Iso-K	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

(Iso-K= Istotypkontrolle)

### 3.6. KOMMERZIELLE TESTS FÜR DIE SEROLOGISCHE UND ZELLULÄRE DIAGNOSTIK

BD™ ELISPOT Human IL-5 ELISPOT Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD™ ELISPOT Human IL-10 ELISPOT Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD™ ELISPOT Human IFN-γ ELISPOT Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

### 3.7. VERBRAUCHSMATERIALIEN

24-/48-well (Loch)-Platten, steril	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
96-well (Loch)-Rundbodenplatten, steril	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Combitips® 5ml, steril/unsteril	Eppendorf, Hamburg
Deckgläschen für Neubauer Zählkammer, 20 x 26mm	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Einweg-Pipetten 1ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml, steril	Greiner, Frickenhausen
Einfrier-Röhrchen (Cryo's) 2ml, steril	Greiner, Frickenhausen
FACS-Röhrchen (Polystyren- Röhrchen 5ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Glasfiberfilter EasyTab™-C Self- Aligning Filters	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau- Jugesheim
Millex®-Sterilfilter, Porengröße 0,22µm	Milipore GmbH, Schwalbach
Monovette® (CPDA)	Sarstedt, Nümbrecht
Monovette® (Serum-Gel)	Sarstedt, Nümbrecht
Pasteurpipetten Glas	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Pipettenspitzen	Kalensee, Gießen

Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Stericup® 250ml, 500ml, Porengröße 0,22µm	Millipore GmbH, Schwalbach
Zentrifugen-Röhrchen 15ml, 50ml	Greiner, Frickenhausen

### 3.8. GERÄTE

Analysenwaage 770	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Auflicht-Mikroskop Axiostar	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAccl® 150	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einfrierbehälter Qualifreeze	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
ELISPOT Scanner Eli.Scan	A.EL.VIS, Hannover
ImmunoCap®100	Phadia AB, Uppsala, Schweden
Kühlzentrifuge Megafuge® 1.0	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Mehrkanalpipette Discovery 200-200µl	ABIMED, Langenfeld
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen
pH-Meter CyberScan pH 510	Eutech Instruments Europe, Nijkerk, Niederlande
Pipettierhilfe BD Falcon™ Express™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Pipetten Research® 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage 440-49N	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern



Reagenz-Reservoir	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Sterilbank HERAsafe <sup>®</sup>	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Stickstofftank Chronos 200	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen
Szintillationsmessgerät TopCount <sup>®</sup> NXT <sup>™</sup>	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jugesheim
Trockenschrank Heraeus Function Line	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Vortexmixer IKA <sup>®</sup> Genius 3	IKA Labortechnik, Staufen
Zellerntegerät MicroBeta <sup>®</sup> FilterMate <sup>™</sup>	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jugesheim

### 3.9. SOFTWARE

Photoshop <sup>®</sup> CS2	Adobe
BD CellQuest <sup>™</sup> Pro	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Eli.Analyse ELISPOT Analysis Office Software V4.2	A.EL.VIS, Hannover
Endnote X2	Thomson ResearchSoft, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, USA
Microsoft <sup>®</sup> Excel	Microsoft, USA
Microsoft <sup>®</sup> Word	Microsoft, USA

## **4. METHODEN**

### **4.1. PATIENTEN**

Acht Patienten der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg wurden in die SLIT-Studie mit Birkenpollenextrakt eingeschlossen. Sechs der acht Teilnehmer waren Frauen. Das Durchschnittsalter betrug 35 Jahre mit einer Spannweite von 21-62 Jahren (vgl. Kap.4.2.).

Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg genehmigt.

### **4.2. EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN**

In diese Studie wurden Erwachsene einbezogen, die an einer klinisch relevanten respiratorischen Allergie vom Soforttyp gegen Birkenpollen mit mäßig bis schwerer saisonaler Rhinoconjunctivitis allergica (RCA) und/oder einem kontrolliertem Asthma bronchiale litten.

#### **Einschlusskriterien:**

- Beschwerdemaximum im Frühjahr
- Alter zwischen 18 und 65 Jahren
- *In vivo*-Nachweis für IgE-vermittelte Sensibilisierung gegen Birkenpollen: positiver Pricktest
- *In vitro*-Nachweis für eine Sensibilisierung: spezifisches IgE der CAP-Klasse  $\geq 2$  gegen Birkenpollenextrakt und spezifisches IgE der CAP-Klasse  $\geq 1$  gegen rekombinantes Bet v 1
- schriftliche Einverständniserklärung

**Ausschlusskriterien:**

- Minderjährige und nicht einwilligungsfähige Patienten
- Polysensibilisierungen mit perennialen Symptomen, klinisch relevante Allergien gegen weitere Pollenallergene
- Begleiterkrankungen wie schwere Autoimmunkrankheit, Immunschwäche, klinisch relevantes Malignom
- Moderates oder schweres bzw. insuffizient therapiertes Asthma bronchiale mit irreversibler Atemwegsobstruktion (forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde (FEV1) unter 70% des Normwertes)
- Medikamente: tägliche Einnahme von oralen Steroiden, Antihistaminika, trizyklischen Antidepressiva, organotoxischen Medikamenten, Betablockern
- Kardiovaskuläre Erkrankung mit erhöhtem Risiko von Nebenwirkungen nach Adrenalingabe (außer bei Insektengiftallergie)
- Sonstiges: Schwangerschaft oder Stillperiode, positive Testergebnisse auf HIV1, HIV2, Hepatitis B und C, Drogenmissbrauch (einschließlich Alkohol), zu erwartendes unzureichendes Kooperationsverhalten des Patienten

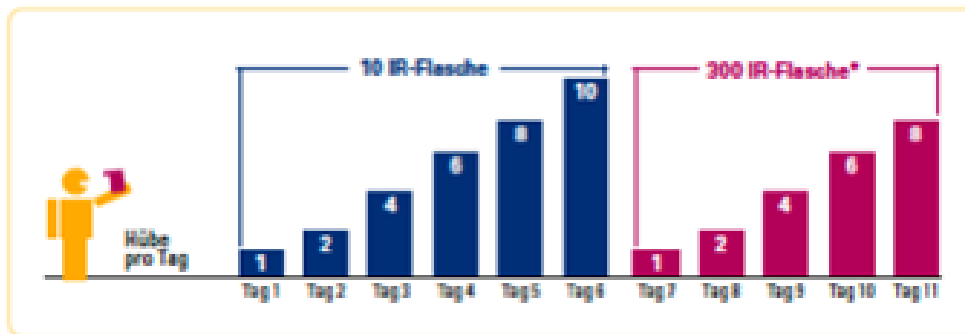
**4.3. DURCHFÜHRUNG DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE**

Alle acht Patienten erhielten gemäß geltender Leitlinien und standardisiertem Dosierungsschema eine SLIT gegen Birkenpollen über ein Jahr mit Staloral®, das als zugelassenes Fertigarzneimittel Staloral300® Birke zur Verfügung steht.

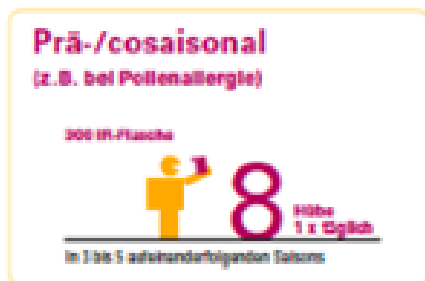
Die Einleitungsbehandlung, bei der eine täglich steigende Allergendosis mittels einer Dosierpumpe über einen Zeitraum von elf Tagen gegeben wurde, erfolgte außerhalb der Pollenflugsaison (zwischen September bis Dezember), sodass die Aufdosierungsphase vor Beginn der Birkenpollenflugsaison beendet war. Die am Ende der Steigerungsphase gut vertragene Höchstdosis von ca. 120 I.R. (*Index of reactivity*, Reaktivitätsindex) wurde in der anschließenden Erhaltungsphase täglich oder mehrmals wöchentlich über ein Jahr

eingegenommen. Folgende Dosierschemata waren richtungsweisend für die Einnahme (siehe Abbildung 5).

### A Einleitungsbehandlung



### B Fortsetzungsbehandlung



**Abbildung 5: Dosierungsschema von Staloral300® Birke zur Einleitungsbehandlung und zur ganzjährigen Fortsetzungsbehandlung.**

- A. Während der ersten elf Tage wurde täglich die Dosis des Allergens nach dem in der Abbildung aufgeführten Therapieschema erhöht und über eine Dosierpumpe verabreicht (modifiziert nach Stallergenes).
- B. In der Aufrechterhaltungsphase wurden im Anschluss an die Einleitungsphase vier Hübe in der Konzentration 300 I.R./ml (entspricht 120 I.R.) mehrmals wöchentlich über 1 Jahr eingenommen (modifiziert nach Stallergenes).

Die Tropfen sollten möglichst morgens vor dem Frühstück auf nüchternen Magen und selbständig durch den Patienten eingenommen werden. Die entsprechende Anzahl an Hüben wurde unter die Zunge gegeben und nach zwei Minuten heruntergeschluckt.

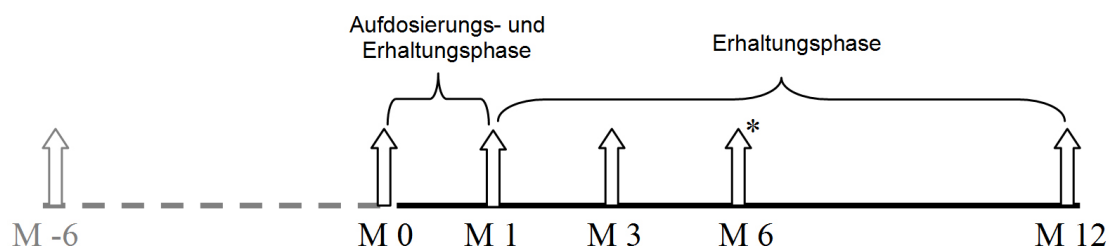
Wurden die empfohlenen Einnahmeintervalle nicht eingehalten (z.B. wegen akuter Erkrankung, Schutzimpfung oder Vergessens), sollte nach Absprache mit dem Arzt eine erforderliche Dosisreduktion in Erwägung gezogen werden. Auch Beschwerden wie Juckreiz, Anschwellen der Zunge, gastrointestinale Leiden während der Einnahme einer nächst höheren Dosis, sollten dem in der

Allergieambulanz behandelnden Arzt mitgeteilt werden, um die Dosis entsprechend neu anzupassen.

Wurde die Einnahme einen Tag während der Grundbehandlung ausgelassen, sollte noch einmal die letzte Dosis vor weiterer Dosissteigerung eingenommen werden. Bei einer Therapieunterbrechung, die mehr als einen Tag beinhaltete, wurde empfohlen pro ausgelassenen Einnahmetag einen Schritt im Dosisschema zurückzugehen. Anschließend sollte es gemäß dem Dosisschema zu einer erneuten Steigerung kommen.

#### 4.4. STUDIENDESIGN

Während der zwölfmonatigen SLIT mit BPA wurde den Patienten als projektbedingte Handlung vor Therapiebeginn (M0) sowie nach 1, 3, 6 und 12 Monaten (M1, M3, M6, M12) Blut entnommen, um den immunologischen Status zu identifizieren (Bestimmung der Frequenz allergenspezifischer Th1, Th2 und Tr1 sowie der Konzentration von Gesamt-IgE, spezifischem IgE und IgG4-Antikörpern). Der Verlauf wurde so gewählt, dass wichtige Phasen der SLIT wie Aufdosierungs-, Erhaltungs- und Birkenpollenflugphase erfasst und mit Zeitpunkten außerhalb der Saison verglichen werden konnten (vgl. Abbildung 6).



**Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf der Blutentnahmen während der sublingualen Immuntherapie (SLIT).**

M0 bezeichnete den Zeitpunkt unmittelbar vor Therapiebeginn. M1 erfasste neben der kurzen Aufdosierungs-, die nach elf Tagen abgeschlossen war, auch die sich anschließende Erhaltungsphase nach einem Monat. Weitere Blutentnahmen erfolgten nach drei (M3) und nach sechs Therapiemonaten (M6) während der Pollenflugsaison (mit Sternchen markiert). Der Zeitpunkt M12 markiert die Blutentnahme nach einjähriger SLIT. Die Kennzeichnung M-6 beinhaltet die dem Therapiebeginn vorangegangene Birkenpollenflugphase.

Standardisierte Fragebögen zu definierten Zeitpunkten dienten der Abgrenzung klinischer Beschwerden und des symptomatischen Medikamentenverbrauchs. Die klinische Wirksamkeit der SLIT wurde mit Hilfe eines Pricktests vor und nach einjähriger Therapie bestimmt.

## **4.5. KLINISCHE BEWERTUNG**

Die klinische Bewertung, d.h. die Erfassung des subjektiven klinischen Symptomscores und die Durchführung des objektiven Pricktests vor und während der Therapie führten ärztliche und technische Mitarbeiter der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg durch.

### **4.5.1. KLINISCHER SYMPTOMSCORE**

Um die klinischen Parameter zu erfassen, wurden auf einer numerischen Skala von 1-7 Symptomscores bezüglich des „Schweregrades der allergischen Erkrankung“ erfasst. Die Daten wurden zum Zeitpunkt der Birkenpollensaison (M6) im Vergleich zur vorherigen Pollensaison (M-6; vgl. Abbildung 6) erhoben. Patienten ordneten die folgenden Zahlen dem Schweregrad ihrer allergischen Erkrankung zu:

- 1 „extrem schwer krank“
- 2 „schwer krank“
- 3 „deutlich krank“
- 4 „mäßig krank“
- 5 „nur leicht krank“
- 6 „Grenzfall allergische Erkrankung“
- 7 „überhaupt nicht krank“

Da es schwierig ist, die Beschwerden verschiedener Betroffener aufgrund unterschiedlicher subjektiver Interpretationen und Empfindungen der klinischen

Symptome auf einer Skala darzustellen, wird in der Auswertung besonderer Augenmerk auf die Änderung der Befindlichkeitsangaben im Vergleich zur Vorsaison gelegt. Auf diese Weise konnten individuelle Verbesserungen bzw. Verschlechterungen des Schweregrades der allergischen Erkrankungen detektiert werden.

#### **4.5.2. MEDIKAMENTENVERBRAUCH**

Analog zur Bestimmung des Symptomscores konnte die Änderung der symptomatischen Medikation während der SLIT von den Probanden mit folgenden Ziffern in Bezug auf den Medikamentenverbrauch während der Birkenpollensaison vor Therapieinitiation (M-6) beschrieben werden:

- 3 „sehr viel mehr“
- 2 „viel mehr“
- 1 „etwas mehr“
- 0 „unverändert“
- 1 „etwas weniger“
- 2 „viel weniger“
- 3 „sehr viel weniger“

#### **4.5.3. PRICKTEST**

Der Pricktest wurde als objektiver Test für eine allergische Reaktion vom Soforttyp gegen Birke vor Therapiebeginn (M0) und als Verlaufsparemeter nach einem Jahr (M12) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst auf entfetteter und desinfizierter Unterarmvorderseite der Testperson ein Tropfen Allergenlösung aufgebracht und mit einer Prick-Lanzette unter die Epidermis überführt, wobei darauf geachtet wurde, keine Blutung zu verursachen. Parallel wurden jeweils eine Positivkontrolle mit Histaminhydrochloridlösung (0,1%ig) sowie eine Negativkontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung geprickt. Die Ablesung der Hautreaktionen erfolgte nach 15min, wobei jeweils der

Durchmesser von Quaddel (Urtikaria) und Erythem (Rötung) mit der Reaktion der Positivkontrolle (Voraussetzung: Negativkontrolle ohne Reaktion) verglichen wurde. Die Positivkontrolle entsprach der Größe eines zweifach positiven Ergebnisses und galt als Richtgröße für die durch das BPA hervorgerufene Reaktion. Ein dreifach positives Ergebnis bedeutete, dass der Quaddeldurchmesser größer als die Histaminquaddel war. Bei einem vierfach positiven Befund konnten Pseudopodien detektiert werden, wohingegen eine kleinere durch das BPA hervorgerufene Quaddel im Vergleich mit der Positivkontrolle einem einfach positiven Befund mit einer Quaddel von mindestens 3mm und Rötung von mindestens 5mm Durchmesser entsprach. Ein negatives Resultat war abzulesen, wenn keine Quaddel entstand bzw. die Reaktion der Negativkontrolle glich.

#### **4.6. IMMUNGLOBULIN E- UND IMMUNGLOBULIN G4-MESSUNG**

Mit Hilfe des Phadia ImmunoCap Systems konnten die Gesamtmenge der zirkulierenden IgE-Antikörper (Gesamt-IgE), die spezifischen IgE-Antikörper gegen Bet v 1 und BPA sowie BPA-spezifische IgG4-Konzentrationen im Serum bestimmt werden. Das Prinzip beruht auf einem Fluoro-Enzym-Immuno-Assay (FEIA), bei dem Antikörper gegen das menschliche IgE kovalent an das ImmunoCAP gebunden sind. Nachdem die Serumproben in die ImmunoCaps gegeben und mit enzym-markierten anti-IgE oder anti-IgG4 inkubiert wurden, konnte mit einer Enzym-Substrat-Reaktion die Fluoreszenzintensität mit Hilfe eines entsprechenden Messinstruments detektiert werden.

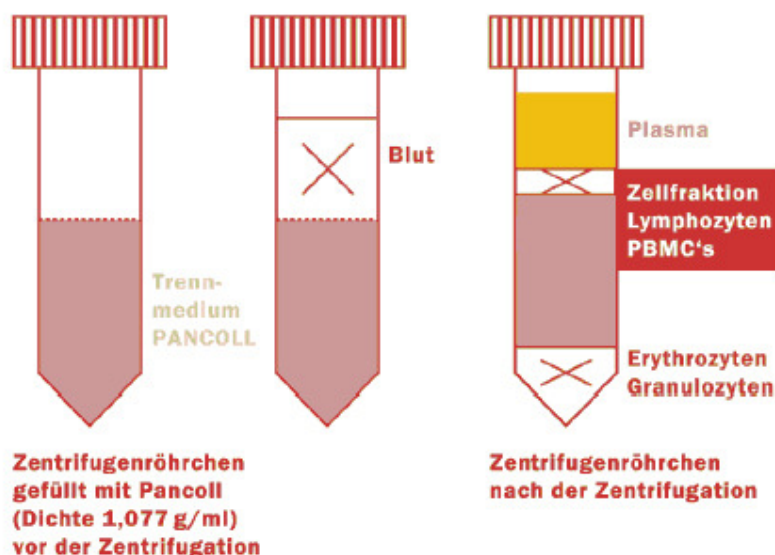
#### **4.7. ZELLULÄRE DIAGNOSTIK**

##### **4.7.1. ZELLSEPERATION MITTELS DICTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION**

Um die für die *in vitro*-Untersuchungen benötigten PBMC aus mit Antikoagulantien (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin; CPDA) versetztem Vollblut zu isolieren, wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Die



dabei eingesetzte Trennlösung Pancoll besteht aus dem neutralen, hoch vernetzten, hydrophilen Polymer Ficoll und besitzt eine Dichte von 1,077 g/ml. Nach Zentrifugation (1300rpm, 22°C, 10min) des CPDA-Blutes wurde das Plasma abpipettiert und bei -20°C eingefroren. Anschließend wurde das Blut-/PBS-Gemisch (Verhältnis 1:2) vorsichtig auf vorgelegtes Ficoll (Verhältnis 3:1) geschichtet und ohne Aktivierung der Bremse zentrifugiert (1500rpm; 22°C; 30min). Nach der Zentrifugation ergab sich im Falconröhrchen folgende Schichtung der Blutbestandteile bzw. Lösungen innerhalb des Dichtegradients von unten nach oben gesehen: Erythrozyten und Granulozyten (Sediment), Ficolllösung, Lymphozyten und Monozyten (Interphase), PBS und Thrombozyten (Überstand) (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 7: Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) durch Ficoll-Dichtegradienten aus Vollblut.**

Mit Phosphatlösung gepufferter Salzlösung-verdünntes Blut wird auf die Ficolllösung geschichtet und zentrifugiert. Erythrozyten und polymorphkernige Leukozyten oder Granulozyten sinken aufgrund der höheren Dichte ab. Mononukleäre Zellen, die aus Lymphozyten und Monozyten bestehen, bleiben auf der Ficollschicht liegen und können an der Grenzschicht als Interphase abgenommen werden (modifiziert nach PAN biotec GmbH).

Die Interphase (PBMC-Schicht) wurde sorgfältig abgenommen, in neue Falconröhrchen überführt, mit kaltem PBS auf 50ml aufgefüllt und zentrifugiert

(1800rpm; 4°C; 10min). Als ein weiterer Waschschrift wurde der Überstand danach abgegossen, mit kaltem PBS aufgefüllt und resuspendiert. Nach Zentrifugation (1300rpm; 4°C; 10 min) und nach Dekantieren des Überstandes wurden die PBMC-Pellets in RPMI<sup>++</sup> aufgenommen.

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte, indem ein Aliquot der betreffenden Zellsuspension mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 verdünnt und anschließend in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt wurde. Es können mit dieser Methode lebende Zellen, deren Membran intakt und für den Farbstoff nicht permeabel ist, von toten Zellen, welche sich blau anfärben, unterschieden werden. Vier Großquadrate (Fläche: 1mm<sup>2</sup>, Tiefe: 0,1mm, Volumen: 0,1µl) der Neubauer-Zählkammer wurden für die Berechnung der Zellzahl ausgezählt. Mit nachfolgender Formel wurde letztendlich die Anzahl lebender Zellen innerhalb der Zellsuspension bestimmt:

$$\text{Zellzahl /ml} = \text{Summe der gezählten Zellen} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} (=2) \times 10^4$$

#### **4.7.2. KRYOKONSERVIERUNG VON PERIPHEREN MONONUKLEÄREN ZELLEN UND AUFTAUPROZEDUR**

Die in RPMI<sup>++</sup> aufgenommenen Zellen mussten erst abzentrifugiert (1300 rpm; 4°C; 10 min) und anschließend für die Kryokonservierung mit einer Zelldichte von 5-10 x 10<sup>6</sup> Zellen /ml in FCS mit DMSO aufgenommen werden. In einem mit 2-Propanol befüllten Einfrierbehälter wurden die Zellen für 24-48h in einen -80°C Kühlschrank gestellt, langsam eingefroren (Temperaturreduktion um 1°C/min), um dann in den Stickstofftank überführt zu werden.

Nach dem Auftauen im Wasserbad bei 37°C konnten die PBMC in RPMI<sup>++</sup> aufgenommen und zentrifugiert werden (1300 rpm; 4°C; 10 min). Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen anschließend in RPMI<sup>++</sup> + 10%PHS resuspendiert. Mit der Neubauer-Zählkammer wurde erneut die Zellzahl bestimmt.

#### 4.7.3. DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Mittels Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*; FACS) werden die phänotypischen Eigenschaften der Lymphozyten untersucht. Die Expression und die Dichte von Molekülen auf der Zelloberfläche können mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, an die Fluorochrome gekoppelt sind, bestimmt werden. Die Methode ermöglicht eine simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie 3-4 verschiedener Fluorochrome. Über einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 bzw. 595nm werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom angeregt. Entsprechend der physikalischen Eigenschaften und der Fluoreszenzmarkierung kommt es zur Streuung des Lichtes und zur Fluoreszenzlichtemission durch Fluorochrome. Photodetektoren erfassen das gestreute und emittierte Licht, wobei das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*; FSC) als ein Größenmaß und das 90°-Streulicht (*side scatter*; SSC) als ein Granularitätsmaß gemessen wird. Farbstoffgekoppelte Antikörper senden unterschiedliche Fluoreszenzsignale aus und werden vom Gerät in den entsprechenden Fluoreszenzkanälen erfasst. Dadurch ist eine zeitgleiche Detektion von bis zu vier Farbstoffen möglich. Mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) markierte Zellen werden vom Argon-Ionenlaser angeregt. Der Diodenlaser hingegen erkennt z.B. mit Allophycocyanin (APC)--markierte Zellen.

Die Gegenüberstellung von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht erlaubt eine Analyse der Lymphozytenpopulation. Um die Expression bestimmter Oberflächenmarker zu bestimmen, werden Fluoreszenzmoleküle verwendet. Anhand dieser Oberflächenmoleküle können lymphozytische Subgruppen identifiziert werden. Bevor die Moleküle der Zelloberfläche angefärbt werden konnten, musste eine Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat (ACK)-Lyse durchgeführt werden, um möglicherweise noch vorhandene Erythrozyten, die das Streulicht der Leukozyten überlagern, zu beseitigen. Durch die ACK-Lyse wird die Zellmembran der Erythrozyten durch Aufbau eines Konzentrationsgefälles mittels Flüssigkeitseinstrom zum Platzen gebracht.

Das Patientenvollblut wurde mit ACK-Lysis-Puffer im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, und anschließend zentrifugiert (1200 rpm; 4°C; 8 min). Nachdem dekantiert und erneut mit dem ACK-Lysis-Puffer aufgefüllt

wurde, musste wiederum 5 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Einer erneuten Zentrifugation mit den gleichen Einstellungen folgte die Zugabe von RPMI<sup>++</sup> Medium und die Resuspension in FACS-Puffer für die nachfolgenden durchflusszytometrischen Untersuchungen.

#### **4.7.4. FREQUENZANALYSE VON CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>LOW</sup> ZELLEN**

Zur Phänotypisierung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>LOW</sup> Treg wurde unmittelbar nach der Entnahme des peripheren Blutes die Durchflusszytometrie durchgeführt, da ihr Anteil nach Kryokonservierung stark abnimmt [Elkord, 2009; Möbs, 2010b]. Zuerst wurden dabei die PBMC durch ACK-Lyse aus CPDA-Blut separiert und in FACS-Puffer aufgenommen (vgl. Kap. 4.7.3.).

1x10<sup>6</sup> Zellen wurden pro Probe in ein FACS-Röhrchen gegeben, in je 1ml FACS-Puffer (PBS + 1%BSA + 0,1% Natriumazid) aufgenommen und anschließend zentrifugiert (1600rpm; 4°C; 5min). Der Überstand wurde verworfen, die farbstoffgekoppelten Antikörperlösungen bzw. die entsprechenden Isotypkontrollen (nach Herstellerangaben) auf das Pellet gegeben und die Röhrchen geschüttelt. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis im Dunkeln wurde zweimal mit je 1ml FACS-Puffer gewaschen (1600rpm; 5min; 4°C). Für die durchflusszytometrische Messung wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem FACS-Calibur<sup>TM</sup>-Gerät sowie mit der Software CellQuest<sup>TM</sup> und basierte auf der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker innerhalb der Lymphozytenpopulation.

Aufgrund der inversen Korrelation zwischen Foxp3<sup>+</sup> und CD127-Expression [Liu, 2006; Seddiki, 2006] wurde die endgültige Treg-Ausbeute über den Anteil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>LOW</sup> Zellen berechnet. Dafür wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern anti-CD4-FITC, anti-CD25-APC und anti-CD127-PE markiert. Um die unspezifischen Bindungen zu berücksichtigen, wurden die entsprechenden Isotypkontrollen mitgeführt.

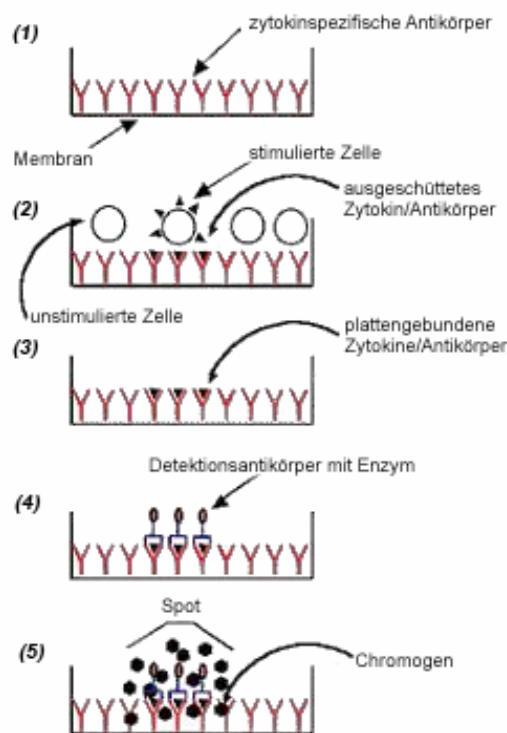
#### 4.7.5. FREQUENZANALYSE ALLERGENSPEZIFISCHER ZELLEN DURCH ENZYME-LINKED IMMUNOSPOT ASSAY

Der *enzyme-linked immunospot assay* (ELISPOT) basiert auf dem Prinzip eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) und wird zur Detektion von aktivierten T-Zellen eingesetzt [Czerkinsky, 1988]. Beim ELISPOT können einzelne allergenspezifische Zellen nach Stimulation anhand des Zytokinsekretionsmusters quantitativ identifiziert werden, wohingegen der ELISA die Gesamtkonzentration an produziertem Zytokin bestimmen kann. Für die Frequenzbestimmung allergenspezifischer T-Zellen wurden 96-well-MultiScreen-Platten (hydrophobe Immobilon-P (Polyvinylidenfluorid; PVDF)-Membran) mit Antikörpern beschichtet, die für das zu identifizierende Zytokin spezifisch sind, und anschließend mit PBMC inkubiert (siehe Abbildung 9). Nach Antigenzugabe wurden innerhalb von 2-24 h Zytokine von den spezifischen T-Zellen freigesetzt und an die zur Beschichtung eingesetzten monoklonalen *capture*-Antikörper gebunden. Nach mehreren Waschgängen wurden die Zellen entfernt und das gebundene Zytokin mit einem sekundären, biotynilierten Detektions-Antikörper, einem enzymgekoppelten Konjugat und einem chromogenen Substrat durch eine kolorimetrische Reaktion sichtbar gemacht. Die entstandenen farbigen Punkte (*spots*), die mittels Computergesteuerten Analysesystemen quantifiziert werden konnten, markierten die gebundenen Zytokine und die Orte, an denen einzelne allergenspezifische T-Zellen reagiert hatten. Die Frequenz zytokinsezernierender Zellen als Antwort auf die spezifische Allergenstimulation korreliert folglich mit der Anzahl der detektierten *spots*.

Die ELISPOT-Methode wurde hier zur Bestimmung der IL-5-, IL-10- und IFN- $\gamma$ -Produktion eingesetzt. Aufgrund typischer Zytokinprofile konnten Rückschlüsse auf die Verteilung der Th1, Th2 und Tr1 gezogen werden.

Die Produktion von IL-10 und IFN- $\gamma$  wird nicht ausschließlich von einer einzelnen mononukleären Zellpopulation, den Th, übernommen. IL-10 wird darüber hinaus von APC und B-Zellen sezerniert; IFN- $\gamma$  dagegen von Monozyten/Makrophagen, CD8<sup>+</sup> zytotoxischen Zellen und NK, die ebenfalls den PBMC angehören, produziert. Um auszuschließen, dass IL-10<sup>+</sup> und IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> *spots* in einem großen Anteil von anderen Zellpopulationen als den Th

produziert werden, wurde bei der Etablierung des ELISPOT-Protokolls zusätzlich mittels FACS-Analyse der Anteil CD4<sup>+</sup> Zellen an dieser Zytokinproduktion bestimmt und festgestellt, dass dieser für die Sekretion der Zytokine im Vergleich zu dem der CD4<sup>+</sup> Zellen gering ist und jene Zellen daher vernachlässigt werden können [Möbs, 2010b]. Th1 weisen wie die NK den Oberflächenmarker CD4 auf, sodass eine Produktion von IFN- $\gamma$  durch NK nicht ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 8: Frequenzbestimmung der zytokinsezernierenden T-Zellen mittels ELISPOT-Verfahren.**

- (1) Binden von zytokinspezifischen Antikörpern auf dem Boden einer 96-Well-Mikrotiterplatte.
- (2) Hinzufügen von durch allergenspezifische Stimulation aktivierten T-Zellen und Binden des sezernierten Zytokins an die *capture*-Antikörper
- (3) Entfernung der T-Zellen
- (4) Zugabe eines zweiten Antikörpers für das gleiche Zytokin, der an ein Farbstoffsubstrat umsetzendes Enzym gekoppelt ist.
- (5) Hinzufügen des Chromogens/Farbstoffsubstrates und Entstehen von einzelnen Farbspots, die einer zytokinproduzierenden T-Zelle entsprechen (modifiziert nach A.EL.VIS., Hannover).

In der folgenden Tabelle wird die Durchführung des ELISPOT-Verfahrens beschrieben.

**Tabelle 2: Durchführung ELISPOT-Verfahrens**

<b>1.Tag Zellaufbereitung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auftauen von kryokonservierten PBMC und Aussaat von <math>1 \times 10^6</math> PBMC/ml in Kulturmedium (RPMI<sup>++</sup> + 10%PHS) auf einer 24-well-Platte</li> <li>• Stimulation mit 10µg/ml Bet v 1</li> <li>• Unstimulierter Ansatz als Negativkontrolle</li> </ul>
<b>3.Tag Expansion spezifischer Zellen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vermehrung der Bet v 1-spezifischen Zellen durch Zugabe von IL-2 (10U/ml) und IL-7 (10ng/ml) [McCutcheon, 1997]</li> </ul>
<b>7.Tag Beschichtung der ELISPOT-Platten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zugabe von monoklonalen <i>anti-human</i> IL-10, <i>anti-human</i> IL-5 und <i>anti-human</i> IFN-γ Antikörpern (5µg/ml Endkonzentration) und Inkubation über Nacht bei 4°C</li> </ul>
<b>8.Tag Blockieren und Zugabe der Zellen nach erneuter Stimulierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Waschen der Platten mit RPMI<sup>++</sup> + 10% FCS</li> <li>• Aufbereiten der Zellen (Waschen der Zellen mit RPMI<sup>++</sup>, Zentrifugation (1200rpm, 4°C, 8min) Aufnahme der Zellen in RPMI<sup>++</sup> + 10% PHS (<math>1 \times 10^6</math>/ml)</li> <li>• Restimulation mit Bet v 1 (10µg/ml) und PHA (1%; Positivkontrolle) der Zellen</li> <li>• Zugabe von 100µl/well RPMI<sup>++</sup> + 10% PHS-Lösung (+/- Bet v 1 oder PHA) und der entsprechenden Zellsuspension (<math>2 \times 10^5</math> Zellen /100µl), Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im befeuchteten Brutschrank für 20h</li> </ul>
<b>9.Tag Detektion</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zugabe des sekundären Detektions-Antikörpers, des Enzymkonjugates Streptavidin-HRP (<i>horse radish peroxidase</i>) und des AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)-Substratreagenz nach Anweisungen des Herstellers (BD Biosciences)</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"><li>• Entwicklung der <i>spots</i> und Trocknen der Membranen</li></ul>
<b>10.Tag</b> <b>Auswertung</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Auswertung der Platten mit dem ELISPOT Platten-Leser Eli.Scan F-3200 und der dazugehörigen Software Eli.Analyse V 4.2</li><li>• Berechnung der Frequenz Bet v 1-spezifischer Zellen aus dem Median der in Triplikaten bestimmten Proben</li></ul>



## **5. ERGEBNISSE**

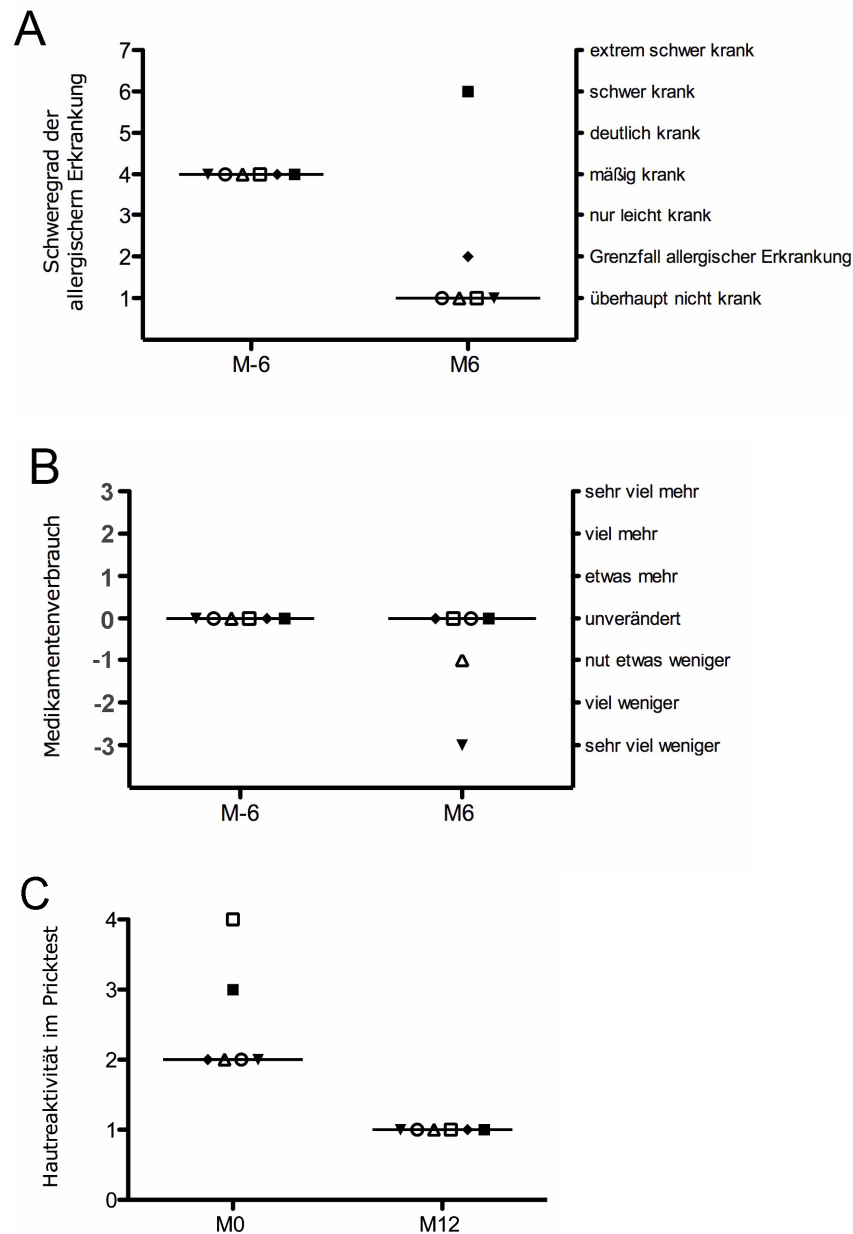
### **5.1. KLINISCHE WIRKSAMKEIT DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE**

Über einen Beobachtungszeitraum von bis zu zwölf Monaten wurden anfänglich acht Birkenpollenallergiker im Rahmen einer SLIT mit BPA-Extrakt (Staloral® 300 Birke) behandelt und deren klinische Verläufe und Medikamentenverbrauch zur symptomatischen Therapie während der Pollenflugzeiten dokumentiert. Zwei der acht Probanden brachen die SLIT vorzeitig aufgrund zu großer Nebenwirkungen (lokale Beschwerden wie Anschwellen der Zunge, Schluckbeschwerden, Juckreiz im Mund) bereits nach dem ersten bzw. zweiten Untersuchungszeitpunkt ab und wurden wegen des unvollständigen Beobachtungszeitraums nicht eingeschlossen, während die restlichen sechs Patienten ihre Therapie über zwölf Monate durchführten.

Die Auswertung des subjektiven Allgemeinbefindens der Studienteilnehmer bezüglich des Schweregrades ihrer allergischen Erkrankung zur Birkenpollensaison unter Therapie (M6) verglichen mit der Pollenflugzeit vor Therapiebeginn (M-6) lieferte Ergebnisse, die eine klinische Wirksamkeit der Therapie zeigte. Unter SLIT verbesserte sich der Symptomscore von „mäßig krank“ auf „überhaupt nicht krank“ (siehe Abbildung 9A).

Keinen Einfluss zeigte die SLIT dagegen auf die Anwendung symptomatischer Medikation, die mit Hilfe einer 7-Punkte-Skala abgefragt wurde (siehe Abbildung 9B). Nur zwei Personen gaben Verbesserungen bezüglich ihres symptomatischen Medikamentenverbrauchs im Vergleich zur vorherigen Saison an.

Ein positiver, objektiver klinischer Effekt der SLIT konnte durch eine verringerte Reaktivität gegenüber dem BPA-Extrakt im Hautpricktest ermittelt werden. Nach zwölf Monaten SIT zeigte sich bei der Pricktestung eine Abnahme der IgE-bedingten Hautreaktion auf das BPA im Vergleich zu den Ausgangsergebnissen bei allen sechs untersuchten Patienten (siehe Abbildung 9C).

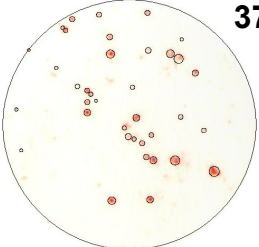
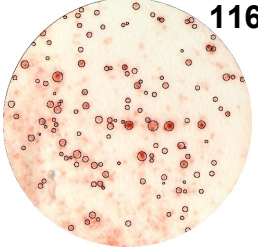
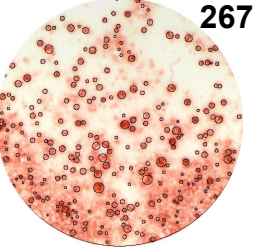


**Abbildung 9: Subjektive und objektive klinische Wirksamkeit der sublingualen Immuntherapie (SLIT) mit Birkenpollenallergen (BPA)-Extrakt.**

Dargestellt sind der klinische Symptomscore (A) und der Medikamentenverbrauch (B). Beide Parameter wurden mit Hilfe von Bewertungen der Patienten auf einer numerischen 7-Punkteskala zum Zeitpunkt der aktuellen Birkenpollenflugsaison (M6) nach sechsmonatiger SLIT und vorherigen Birkenpollensaison vor Beginn der SLIT erhoben (M-6). Eine Verbesserung des Allgemeinbefindens bezüglich des Schweregrades der allergischen Erkrankung konnte neben einem unveränderten Medikamentenverbrauch während der Pollensaison unter Therapie im Vergleich mit den Ausgangswerten gezeigt werden. Die Pricktestergebnisse (C), die vor (M0) und ein Jahr nach Therapiebeginn (M12) gewonnen wurden zeigen eine verringerte Hautreaktivität auf BPA.

## 5.2. FREQUENZEN BET v 1-SPEZIFISCHER T-ZELLPOPULATIONEN IM VERLAUF DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE

Neben klinischen Veränderungen unter SLIT sollten auch Unterschiede hinsichtlich allergenspezifischer T-Zellfrequenzen mit Hilfe des ELISPOT-Verfahrens untersucht werden. Dafür wurde die Sekretion spezifischer „Markerzytokine“ von Bet v 1-stimulierten Zellen quantitativ erfasst. Die ausgeschütteten Zytokine IL-5, IL-10 und IFN- $\gamma$  repräsentierten bestimmte T-Zellpopulationen. Bet v 1-spezifische IL-5<sup>+</sup> *spots* wurden allergenspezifischen Th2 (Abbildung 10), Bet v 1-spezifische IFN $\gamma$ <sup>+</sup> *spots* Th1 und Bet v 1-spezifische IL-10<sup>+</sup> *spots* Tr1 zugeordnet.

	Kontrolle	Bet v 1	PHA
IL-5 (Th2)	 37	 116	 267

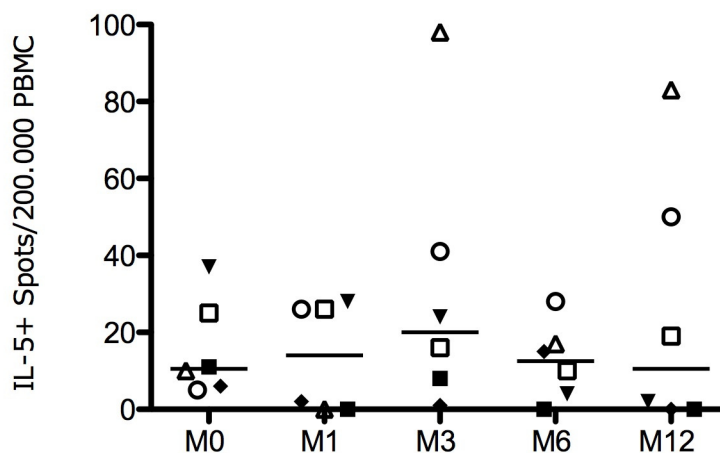
**Abbildung 10: Quantitative Bestimmung zytokinproduzierender Zellen mit Hilfe des enzyme-linked immuno spot assays (ELISPOT)**

Zu sehen sind die charakteristischen ELISPOT-Membranen am Beispiel IL-5-produzierender Zellen, die repräsentativ für Th2 anzusehen sind. Drei verschiedene Ansätze (unstimulierte Kontrolle, Bet v 1- und Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierte Positivkontrolle) dienten der Berechnung von Zellen, die eine spezifische Immunantwort auf Bet v 1 zeigten. Dabei wurden die *spots* der unstimulierten Kontrolle von den antigenstimulierten Proben abgezogen. Das Ergebnis spiegelte die Anzahl an *spots* pro  $2 \times 10^5$  peripheren mononukleären Zellen (PBMC) wieder.

Im Gegensatz zu SLIT-induzierten allergenspezifischen Veränderungen zeigten die Zellfrequenzen nach mitogenem Phytohämagglutinin (PHA)-Stimulus (Positivkontrolle) keine Veränderungen über den zwölfmonatigen Therapieverlauf (Daten nicht gezeigt).

### 5.2.1. FREQUENZVERLAUF DER INTERLEUKIN-5-PRODUZIERENDEN ZELLEN

Wie in der Abbildung 11 dargestellt, wurde die Anzahl der IL-5-produzierenden Zellen durch das ELISPOT-Verfahren über die zwölfmonatige SLIT bestimmt. Insgesamt zeigten sich nur geringfügige Veränderungen. Innerhalb der ersten drei Therapiemonate (M1-M3) kam es zum diskreten Anstieg des Medians IL-5-produzierender Zellen. Dagegen konnte kein weiterer Anstieg in der Pollenflugphase nach sechs Monaten (M6) detektiert werden. Nach zwölf Monaten (M12) wurden Werte erreicht, die denen vor Therapiebeginn glichen.

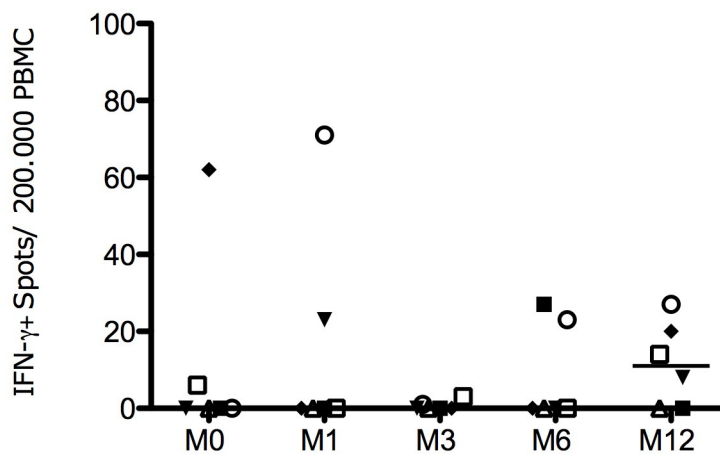


**Abbildung 11: Frequenzverlauf Bet v 1-spezifischer T-Helfer-2-Zellen (Th2) unter sublingualer Immuntherapie (SLIT).**

In der Einleitungsphase und der Erhaltungsphase bis drei Monate nach Therapiebeginn der SLIT (M0-M3) kam es zu einem geringen Anstieg allergenspezifischer Interleukin (IL)-5-produzierender Zellen, während zur Pollenflugsaison (M6) und nach zwölf Therapiemonaten die Zahl der IL-5<sup>+</sup> spots pro  $2 \times 10^5$  PBMC wieder auf Ausgangswerte sank.

### 5.2.2. FREQUENZVERLAUF DER INTERFERON $\gamma$ -PRODUZIERENDEN ZELLEN

Die IFN- $\gamma$ -Produktion Bet v 1-spezifischer Zellen blieb über den Therapiezeitraum von zwölf Monaten nahezu konstant und stieg aber nach zwölf Monaten tendenziell an (siehe Abbildung 12). Im Gegensatz zum Frequenzverlauf der Bet v 1-spezifischen IL-5-produzierenden Zellen kam es nicht zu einer Zellvermehrung in den ersten Monaten der SLIT.

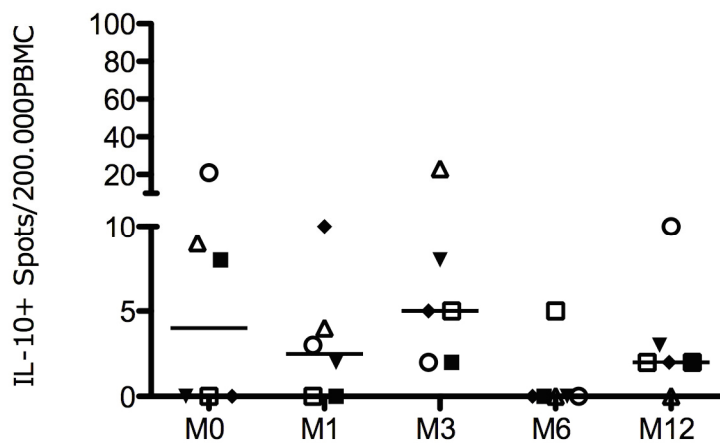


**Abbildung 12: Frequenzverlauf Bet v 1-spezifischer T-Helfer-1-Zellen (Th) unter sublingualer Immuntherapie (SLIT).**

Es zeigte sich ein konstanter Verlauf der Interferon (IFN)- $\gamma^+$  spots pro  $2 \times 10^5$  PBMC über den Verlauf der SLIT mit einem tendenziellen Anstieg nach zwölf Monaten (M12).

### 5.2.3. FREQUENZVERLAUF DER INTERLEUKIN-10-PRODUZIERENDEN ZELLEN

Nur geringfügige Frequenzveränderungen unter SLIT zeigte auch der Verlauf der allergenspezifischen IL-10-sezernierenden Zellen (Abbildung 13). Die Auszählung der IL-10 $^+$  spots zur Messung der Frequenz der Tr1 ergab keine Unterschiede innerhalb der ersten drei Monate nach Beginn der SLIT. In der Pollenflugsaison (M6) sank die Zahl der IL-10 $^+$  spots sogar auf ein Minimum.



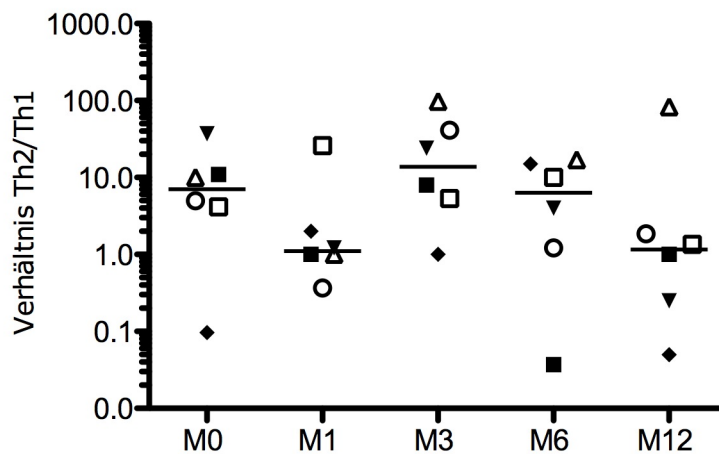
**Abbildung 13: Frequenzverlauf Bet v 1-spezifischer Interleukin (IL)-10-produzierender Zellen unter sublingualer Immuntherapie (SLIT).**

In den ersten drei Monaten (M3) zeigten sich keine Veränderungen der Bet v 1-spezifischen IL-10-produzierenden Zellen, dem dann ein Abfall der Tr1 zur Pollenflugsaison (M6) folgte. Ein Jahr nach Therapiebeginn stiegen die IL-10<sup>+</sup> spots pro  $2 \times 10^5$  periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wieder auf das Ausgangsniveau an.

#### 5.2.4. VERHÄLTNISSE EINZELNER T-ZELLSUBPOPULATIONEN

Da die Korrektur des Missverhältnisses der verschiedenen T-Zellpopulationen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Allergentoleranz zu spielen scheint [Akdis, 2004], sind im Folgenden die Verhältnisse der pathologisch relevanten Bet v 1-spezifischen Th2 zu den potentiell schützenden allergenspezifischen Th1 bzw. Tr1 bestimmt worden.

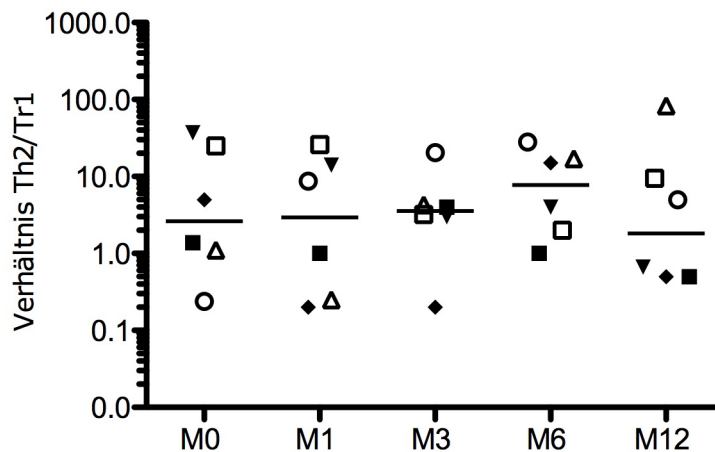
Das Verhältnis von Bet v 1-spezifischen Th2 zu Th1 fiel während des Therapieverlaufs langsam ab (M0-M12), sodass nach zwölfmonatiger Therapie schließlich Werte erreicht wurden, die unter dem Ausgangsniveau lagen (siehe Abbildung 14). Der Anteil von Th1 gegenüber Th2 stieg folglich nach einjähriger SLIT.



**Abbildung 14: Veränderungen im Verhältnis Bet v 1-spezifischer T-Helfer-2- (Th2) zu Th1 unter sublingualer Immuntherapie (SLIT).**

Das Verhältnis allergenspezifischer Interleukin (IL)-5- zu Interferon (IFN)- $\gamma$ -produzierenden Zellen zeigte eine Abnahme im späteren Verlauf der zwölfmonatigen Therapie (M0-M12) und erreichte nach zwölf Monaten einen Tiefstwert. Der initiale Abfall nach dem ersten Monat (M1) ist auf zwei hohe Einzelwerte an IFN- $\gamma^+$  spots zurückzuführen (siehe Abbildung 11).

Das Verhältnis von IL-5 $^+$  zu IL-10 $^+$  spots repräsentiert der Quotient aus Bet v 1-spezifischen Th2 und Tr1. Die Werte blieben während der gesamten zwölfmonatigen Therapie relativ konstant (M0-M12) und stiegen nur in der Pollenflugzeit nach sechs Monaten (M6) leicht an.



**Abbildung 15: Veränderungen im Verhältnis Bet v 1-spezifischer T-Helfer-2- (Th2) zu Typ-1-regulatorischen T- Zellen (Tr1) unter sublingualer Immuntherapie (SLIT).**

Der Quotient aus allergenspezifischen Interleukin (IL)-5- und IL-10-produzierenden Zellen blieb während der SLIT über den Beobachtungszeitraum von zwölf Monaten (M0-M12) relativ konstant. Ein Anstieg des Quotienten war während der Pollenflugsaison zu detektieren, was ein leichtes Überwiegen von Th2 zu diesem Zeitpunkt impliziert, nach zwölf Monaten zeigte sich ein Abfall.

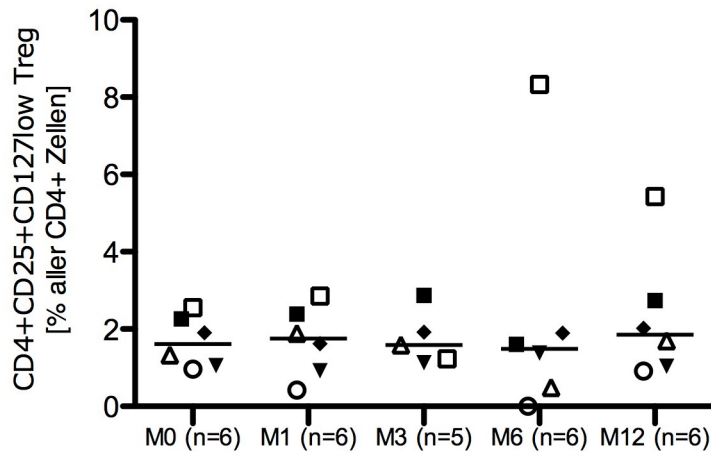
#### **5.2.5. EINFLUSS DER SUBLINGUALEN IMMUNOTHERAPIE AUF DIE ANZAHL DER $CD4^+CD25^+CD127^{LOW}$ REGULATORISCHEN T-ZELLEN**

Die Frequenz der  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  Treg während der zwölfmonatigen SLIT wurde mittels FACS-Analyse ermittelt.

Foxp3<sup>+</sup> Treg gehören zu einer Treg-Subpopulation, die nach Aktivierung Teff-Zellen zellkontaktabhängig supprimieren können. Sie sind wahrscheinlich, wie bereits erwähnt (vgl. Kap.1.7.3.2.), an der Inhibition Th2-vermittelter, allergischer Immunantworten beteiligt [Bellinghausen, 2003; Stassen, 2004]. Da Studien zeigen konnten, dass der vorliegende Zelltyp durch Herunterregulierung des Oberflächenantigens CD127 gekennzeichnet ist, wurde die Oberflächenmarkerexpression  $CD127^{low}$  stellvertretend für die intrazelluläre Bestimmung von Foxp3 gewählt [Liu, 2006; Seddiki, 2006].



Die durchflusszytometrischen Messungen ergaben, dass der sich Anteil der  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  Treg an allen  $CD4^+$ Zellen im Median über die einzelnen Entnahmezeitpunkte nicht veränderte (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Frequenzverlauf der  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  regulatorischen T-Zellen (Treg) während der sublingualen Immuntherapie (SLIT).**

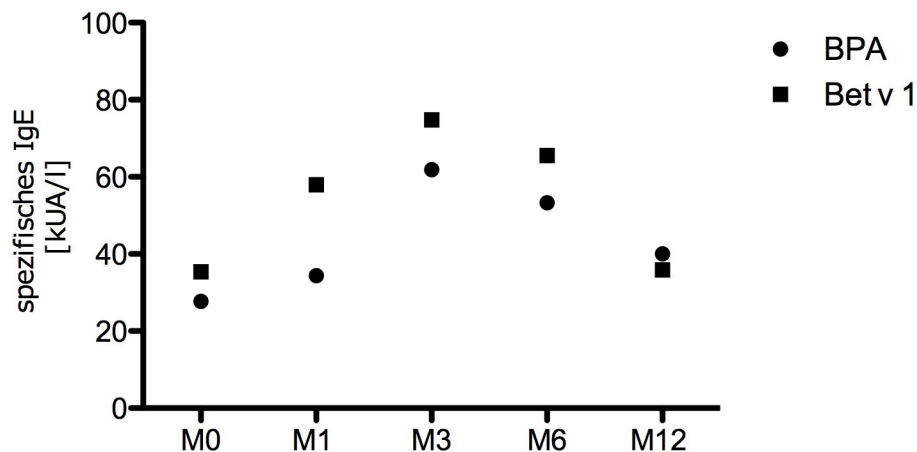
Es zeigten sich keine Veränderungen des Anteils der  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  Treg nach zwölfmonatiger Therapie. Mittels durchflusszytometrischer Messungen konnten die Zellen über Oberflächenmarker  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  als eine Subpopulation aller peripheren  $CD4^+$  Blutlymphozyten bestimmt werden.

### 5.3. HUMORALE VERÄNDERUNGEN WÄHREND DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE

#### 5.3.1. BESTIMMUNG DER IMMUNGLOBULIN E-KONZENTRATION UNTER SUBLINGUALER IMMUNTHERAPIE

Mit Hilfe des ImmunoCap-Systems sollten Veränderungen im Verlauf der Gesamt-IgE-Level und der Konzentrationen von BPA-spezifischen IgE- und IgG4-Antikörpern unter SLIT im Serum der Patienten erfasst werden. Wegen der Verwendung des rekombinant hergestellten Proteins Bet v 1 zu Stimulation allergenspezifischer T-Zellen *in vitro* wurde ergänzend das spezifische IgE gegen dieses Hauptallergen der Birke bestimmt, gegen das alle

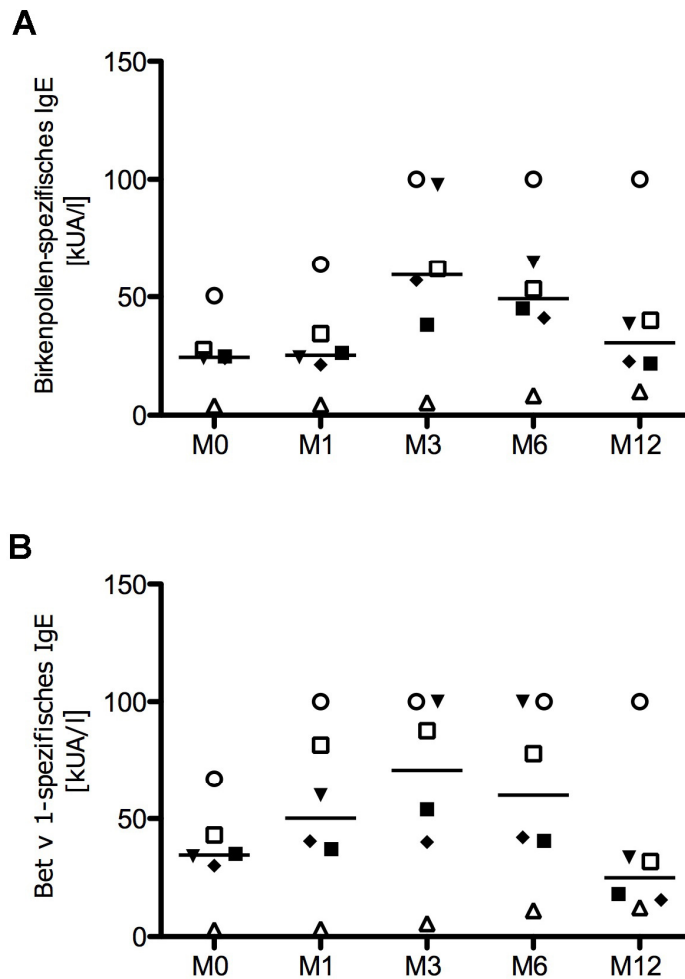
eingeschlossenen Patienten nachweisbar reagierten. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide Konzentrationen, sowohl die der BPA- als auch der Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörper, über den Therapiezeitraum von zwölf Monaten ähnliche Verläufe beschrieben (siehe Abbildung 17).



**Abbildung 17: Der Verlauf Birkenpollenallergen (BPA)-spezifischer Immunglobulin (Ig)E- und Bet v 1-spezifischer IgE-Antikörperkonzentrationen unter spezifischer sublingualer Immuntherapie (SLIT).**

Abgebildet ist der repräsentative Verlauf BPA- und Bet v 1-spezifischer IgE-Antikörperkonzentrationen eines Patienten während der zwölfmonatigen SLIT (M0-M12). Bei allen in der Studie inkludierten Patienten waren ähnlich parallele Verläufe zwischen den spezifischen IgE-Konzentrationen zu erkennen. Der Zeitpunkt M6 nach Therapiebeginn repräsentiert die Birkenpollenflugzeit.

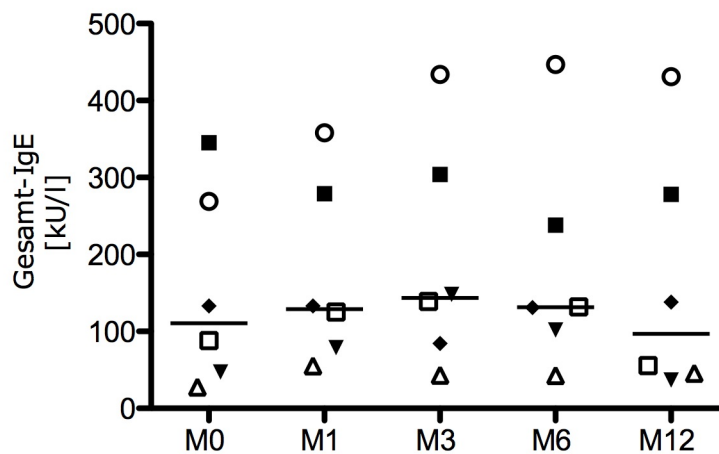
Bedeutende Unterschiede der Konzentrationen der BPA- und Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörper gab es verglichen mit den Ausgangswerten vor Beginn der SLIT nach zwölf Monaten der Hyposensibilisierungstherapie nicht (siehe Abbildung 18). Es fiel nur ein Anstieg der spezifischen IgE-Konzentrationen gegen Bet v 1 und BPA nach drei Monaten Therapie (M3) und zum Zeitpunkt der Pollenflugsaison (M6) bei allen Patienten auf. Dabei standen die Anstiege des spezifischen IgE (vgl. Abbildung 9A) nicht in Verbindung mit einer Verschlechterung des klinischen Befindens.



**Abbildung 18: Spezifische Immunglobulin (Ig)E-Antikörperkonzentrationen unter sublingualer Immuntherapie (SLIT).**

Es kam zu einem leichten saisonalen Anstieg (M6) der Serumkonzentrationen der Birkenpollenallergen (BPA)- und Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörper unter zwölfmonatiger SLIT. Im Vergleich zu den Werten vor Therapie blieben die IgE-Konzentrationen nach zwölf Monaten konstant.

Bei der Messung der Gesamt-IgE-Antikörperkonzentrationen über den Therapieverlauf von zwölf Monaten konnten keine größeren Schwankungen festgestellt werden. In den ersten drei Monaten kam es zu einem leichten Anstieg der IgE-Konzentrationen und zum Ende des Beobachtungszeitraumes zu einem tendenziellen Abfall der Werte unter Ausgangsniveau (M12).

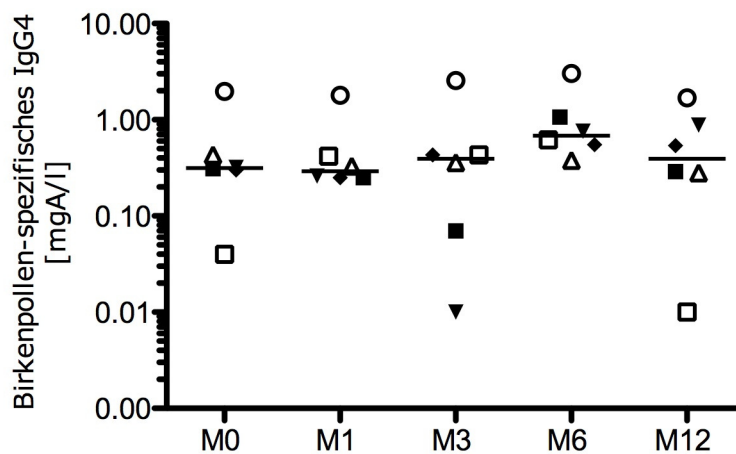


**Abbildung 19: Gesamt-Immunglobulin (Ig)E-Antikörperkonzentrationen unter sublingualer Immuntherapie (SLIT).**

Die Gesamt-IgE-Antikörperkonzentrationen blieben über den Therapieverlauf relativ unverändert. Nach einem initialen leichten Anstieg innerhalb der ersten drei Monate unter SLIT (M3), fielen die Gesamt-IgE-Antikörperkonzentrationen nach zwölf Monaten unter die Ausgangswerte (M12).

### **5.3.2. BESTIMMUNG DER IMMUNGLOBULIN G4-KONZENTRATION UNTER SUBLINGUALER IMMUNTHERAPIE**

Im Gegensatz zum Verlauf der spezifischen IgE-Antikörperkonzentrationen stiegen die Serumkonzentrationen von BPA-spezifischem IgG4 erst nach sechs Monaten, während der Pollenflugzeit an. Nach zwölf Monaten waren die Werte gegenüber den Ausgangskonzentrationen immer noch leicht erhöht.

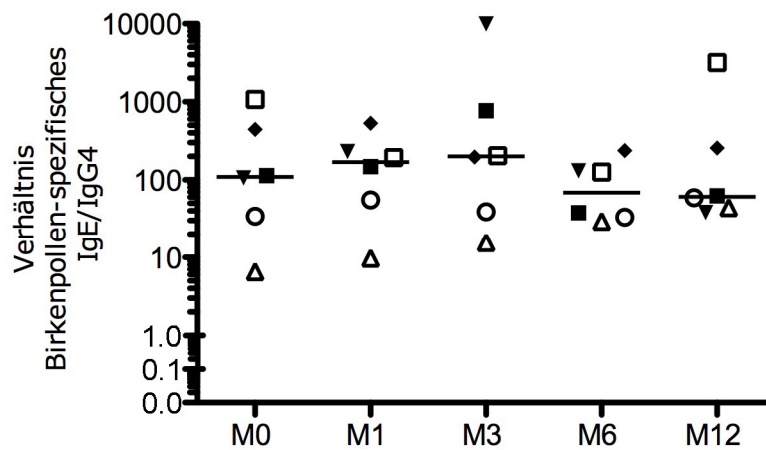


**Abbildung 20: Birkenpollenallergen (BPA)-spezifische Immunglobulin (Ig)G4-Antikörperkonzentrationen unter sublingualer Immuntherapie (SLIT).**

Während der Therapie über zwölf Monate kam es zu einem tendenziellen Anstieg der BPA-spezifischen Antikörperproduktion mit einem Höhepunkt zur Pollenflugsaison (M6). Im Vergleich zum Ausgangswert waren die IgG4-Konzentrationen nach zwölf Monaten noch leicht erhöht.

Studien zeigen, dass nicht der alleinige Anstieg von spezifischen IgG4-Antikörpern für eine verbesserte klinische Symptomatik verantwortlich ist, sondern dass vielmehr das Verhältnis von allergenspezifischem IgE zu IgG4 als entscheidend für den Erfolg einer SLIT angesehen werden kann [Bahceciler, 2005; Tseng, 2008].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis zwischen BPA-spezifischem IgE und IgG4 über den Therapieverlauf abfiel, nachdem es initial nach drei Monaten leicht anstieg. Ab der Pollenflugphase nach sechs Monaten fiel der Quotient unter den Wert vor Therapiebeginn (M0) ab. Es kam somit zu einer Vermehrung von allergenspezifischen IgG4-Antikörpern gegenüber BPA-spezifischem IgE.



**Abbildung 21: Verhältnis zwischen Birkenpollenallergen (BPA)-spezifischen Immunglobulin (Ig)E und IgG4-Antikörpern unter sublingualer Immuntherapie (SLIT).**

Im Verlauf der SLIT konnte ein Abfall des Verhältnisses von BPA-spezifischen IgE- und IgG4-Antikörpern nach sechs und zwölf Monaten unter den Ausgangswert vor Therapiebeginn beobachtet werden, nachdem noch initial ein Anstieg in der Aufdosierungsphase zu beobachten war (M1-M3).

## **6. DISKUSSION**

### **6.1. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEN IMMUNOLOGISCHEN PARAMETERN UND DER KLINISCHEN SYMPTOMATIK UNTER SUBLINGUALER IMMUNTHERAPIE**

Die SLIT wird in Europa immer häufiger zur Behandlung von Soforttypallergien verwendet und der klinische Erfolg dieser Hyposensibilisierungsmethode ist in Metaanalysen ausreichend bestätigt worden [Wilson, 2005; Calamita, 2006; Penagos, 2008]. Trotz der wachsenden Bedeutung und der generellen Zustimmung für die Wirksamkeit der SLIT gibt es nur wenige Studien, die detaillierte immunologische Untersuchungen beinhalten. Daher werden Studien gefordert, in denen der genaue Wirkmechanismus dieser Behandlungsform eingehender untersucht werden soll.

Unter konventioneller subkutaner Immuntherapie kommt es zu verschiedenen immunologischen Veränderungen. Dazu gehören eine Verschiebung des Th1-/Th2-Verhältnisses zugunsten der Th1-Antwort [Durham, 1996; Ebner, 1997], eine teilweise geringe Verminderung der allergenspezifischen IgE-Produktion [Gleich, 1982; Van Ree, 1997] und ein Klassenwechsel zugunsten der Bildung von IgG, besonders der Untergruppe IgG4, die mit einer abgeschwächten allergischen Entzündungsreaktion einhergeht [Aalberse, 1983; Bellinghausen, 1997]. Des Weiteren ist die Zahl der Effektorentzündungszellen, wie Eosinophile, Mastzellen und Basophile, nach Therapie in allergischen mukosalen Geweben verringert [Wilson, 2001]. Außerdem konnten abgeschwächte periphere T-Zellantworten im Blut nach Allergenstimulation festgestellt werden [Secrist, 1993; Jutel, 1995; McHugh, 1995; Akoum, 1996]. Die periphere T-Zell-Toleranz scheint u.a. auf die Bildung allergenspezifischer Treg und deren Zytokinproduktion, IL-10 und TGF- $\beta$ , zurückzuführen sein [Akdis, 1996; Akdis, 1998; Francis, 2003; Jutel, 2003]. Erhöhte IFN- $\gamma$ -Antworten und parallel verringerte Haut- und nasale Spätphasereaktionen wurden im Rahmen einer Gräserpollenimmuntherapie nach Allergenstimulation beobachtet [Varney, 1993].

Um die spezifischen T-zellulären und humoralen Veränderungen bei Birkenpollenallergikern während einer SLIT zu analysieren und mögliche Verlaufsparemeter für die Entwicklung einer Allergentoleranz aufzufindig zu machen, wurden im Rahmen dieser Arbeit T-Zellfrequenzen anhand ihrer typischen Zytokinausschüttung (IL-5, IL-10 und IFN- $\gamma$ ) sowie ihrer Oberflächenmoleküle ( $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ ) gemessen und humorale Veränderungen (spezifisches IgG4 und IgE; Gesamt-IgE) erfasst, die klinische Effektivität anhand von Symptomskalen bewertet und Untersuchungen der Hautreaktivität der Probanden mit Hilfe von Pricktests durchgeführt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, einfach blind geführte Anwendungsbeobachtungen über ein Jahr, zeigten neben einem unveränderten Frequenzverlauf der  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  Zellen, eine fehlende Induktion von Bet v 1-spezifischen Tr1, einen leichten Anstieg der allergenspezifischen IgG4-Produktion während der Pollensaison und eine im späteren Verlauf der SLIT detektierbare Bet v 1-spezifische Th1-Immunantwort nach zwölf Monaten. Diese zellulären und humoralen Mechanismen stehen im Zusammenhang mit einer abgeschwächten Hautreaktivität im Pricktest nach einem Jahr SLIT verglichen mit Reaktionen vor Therapiebeginn und verbesserter klinischer Beschwerdesymptomatik während der Pollenflugsaison unter Therapie.

## **6.2. WIRKSAMKEIT DER SUBLINGUALEN IMMUNOTHERAPIE**

In der vorliegenden Studie gaben die Patienten auf einer numerischen 7-Punkte-Skala Veränderungen des Schweregrades ihrer Erkrankung und des Medikamentenverbrauches während der Pollenflugzeit unter SLIT im Vergleich zur vorherigen Saison ohne Therapie an. Dabei zeigte sich eine deutliche Verbesserung des subjektiven Empfindens des Schweregrades der allergischen Erkrankung. Mit Ausnahme von zwei Patienten, die zu dieser Zeit an einem grippalen Infekt litten, bewerteten alle Probanden den Zustand ihrer Erkrankung im Vergleich zur vorherigen Saison als „überhaupt nicht krank“. Dies korreliert mit der im Pricktest gezeigten Reduktion der IgE-bedingten Hautreaktivität gegen BPA von doppelt positiv auf einfach positiv bei allen



Patienten und einer leicht verringerten IgE-Gesamtkonzentration nach einem Jahr der SLIT. Es wird dadurch subjektiv und objektiv der klinische Erfolg der Therapie belegt, der auch in anderen Arbeiten beschrieben wurde [Clavel, 1998; Wilson, 2001; Calderon and Essendrop, 2006].

Eine Metaanalyse von Wilson et al. fasst die Ergebnisse von 22 randomisierten kontrollierten SLIT-Studien zusammen [Wilson, 2003]. Dabei zeigt sich zusätzlich zu verbesserten klinischen Symptomen insgesamt ein verminderter Medikamentenverbrauch unter SLIT, was in dieser Arbeit jedoch nicht festgestellt werden konnte. Ursächlich dafür könnten sich Einflüsse auf die Medikamenteneinnahme während der Pollensaison erst ab längeren Beobachtungszeiträumen (> zwölf Monate) bemerkbar machen. Pradalier et al. sehen ebenfalls keine Reduktion der Medikation nach fünf Monaten SLIT [Pradalier, 1999], wohingegen Compalati et al. eine deutliche Verbesserung der Medikamenteneinnahme bei HSM-Allergikern nach 24-monatiger SLIT verzeichnen konnten [Compalati, 2009]. Ein längerer Beobachtungszeitraum wäre folglich in nachfolgenden Studien hilfreich, um einen verringerten Medikamentenverbrauch unter SLIT zu detektieren.

Andererseits könnte die sehr stark untergliederte Antwortskala für einen unveränderten Medikamentenverbrauch verantwortlich sein. Sie erhob retrospektiv die Informationen zur vorherigen Birkenpollenflugsaison vor Beginn der Immuntherapie, die ungefähr sechs Monate zurücklag, was die Ungenauigkeit der Angaben erklären kann. Zudem hätte eine prospektive Erhebung von definitiven Dosisangaben bzw. Präparatnamen eine präzisere Erfassung von klinischen Parametern möglich gemacht.

### **6.3. EINFLUSS DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE AUF REGULATORISCHE T-ZELLEN**

Treg können in  $\text{Foxp3}^+$  und  $\text{Foxp3}^-$  Treg eingeteilt werden, wobei man die  $\text{Foxp3}^+$  Treg in nTreg und iTreg unterscheidet [Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009] (vgl. Kap. 1.7.3.). Während natürliche  $\text{Foxp3}^+$  Treg im Thymus entstehen [Piccirillo and Shevach, 2004], werden adaptive Treg in der Peripherie durch Antigene induziert. Vermutet wird, dass nTreg und iTreg aufgrund ihres

unterschiedlichen Entstehungsmechanismus verschiedene TCR-Repertoires und somit auch verschiedene Funktionen aufweisen. Adaptive Foxp3<sup>+</sup> scheinen bspw. im Bereich der mukosalen Toleranz und der chronischen allergischen Entzündung eine Rolle zu spielen [Curotto de Lafaille, 2008].

### **6.3.1. TYP-1-REGULATORISCHE T-ZELLEN IM VERLAUF DER SUBLINGUALEN IMMUNOTHERAPIE**

Laut derzeitiger Studienlage spielen Tr1 eine Schlüsselrolle bei der Toleranzinduktion unter konventioneller SIT [Francis, 2003; Akdis, 2004]. Sie zeichnen sich durch hohe Expression des suppressiven Zytokins IL-10 aus [Möbs, 2010b], das für die Senkung der Sekretion bestimmter allergiefördernder Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) [Jutel, 2003] und die Induktion allergen-spezifischer Anergie [Groux, 1996] verantwortlich gemacht wird. Außerdem kann IL-10 direkt Effektorzellen, wie Monozyten und Makrophagen, hemmen [de Waal Malefyt, 1991; Royer, 2001].

Tr1 gehören zu den Foxp3<sup>+</sup> Zellen [Möbs, 2010b] und können auf diese Weise gut von den Foxp3<sup>-</sup> Zellen unterschieden werden [Vieira, 2004]. Sie sind durch die IL-10-vermittelte zellkontaktunabhängige Suppression des Teff-Zellwachstums in Kokultivierungsversuchen charakterisiert [Satoguina, 2008].

Der Frequenzverlauf der Bet v 1-spezifischen Foxp3<sup>+</sup> Tr1 zeigte sich in der vorliegenden Studie unter sublingualer Allergengabe über zwölf Monate unauffällig. Die während einer SIT beschriebene Induktion von IL-10-produzierenden Zellen [Akdis, 1998; Jutel, 2003; Pilette, 2007] blieb aus.

Eine Erklärung für die nicht nachweisbare Induktion von Tr1 aus PBMC könnte sein, dass eine SLIT zu lokaler Induktion IL-10-produzierender Zellen in mukosalen Geweben führt, anstatt eine systemische Vermehrung hervorzurufen, und auf diese Weise nur am Ort der Allergenapplikation eine Toleranzentwicklung initiierte [Pilette, 2007]. Außerdem ist es möglich, dass eine saisonale Rekrutierung Tr1-ähnlicher Zellpopulationen aus der Peripherie zum Effektororgan, wie bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg vermutet, stattgefunden hat [Anderson, 2009] und daher die Tr1 im peripheren Blut unterrepräsentiert waren. Der fehlende Nachweis von SLIT-induzierten Treg kann außerdem in

ihrer kurzen Lebensspanne und der schnellen Entfernung aus der Peripherie begründet sein [Vukmanovic-Stejcic, 2006]. Andere SLIT-Studien beobachteten nur eine kurzfristige Induktion von allergenspezifischen IL-10-sezernierenden Zellen innerhalb der ersten drei Monate unter SLIT [Bohle, 2007]. Der von Bohle beobachtete kurzzeitige Anstieg der Bet v 1-spezifischen Tr1 könnte entweder das Ergebnis klonaler Expansion aus bereits existierenden antigenspezifischen Gedächtnis-Th1 oder Th2 sein [Meiler, 2008] oder der Entstehung neuer Tr1 aus dem Pool naiver T-Zellen zugrunde liegen [Bacchetta, 2002; Roncarolo, 2006]. Spezialisierte IL-10-produzierende DC, die sich in einem unreifen Status befinden oder durch tolerogene Stimuli moduliert wurden, spielen eventuell eine Schlüsselrolle in letzterem Prozess. Unterstützt wird diese Vermutung durch Ergebnisse aus Arbeiten der Arbeitsgruppe um Wakkach et al., die zeigen konnten, dass eine bestimmte Subpopulation von DC dazu fähig ist, in der Gegenwart von IL-10 Tr1 zu induzieren und Toleranz zu generieren [Wakkach, 2003]. Die temporäre Induktion allergenspezifischer IL-10-produzierender Tr1 nach dreimonatiger Therapie, die bei vier der sechs Patienten beobachtet wurde, könnte daher die Reduktion einer übermäßigen Th2-assoziierten Immunantwort während der Birkenpollenflugsaison zur Folge haben und so die klinischen Beschwerden der Patienten vermindern. Des Weiteren ist bei der Interpretation der hier vorgestellten Daten die niedrige Fallzahl zu berücksichtigen.

Neben IL-10 werden weitere Suppressionsmechanismen der Tr1 diskutiert. So wurde festgestellt, dass nicht nur IL-10, sondern auch TGF- $\beta$ , von Tr1 produziert wird und beide Zytokine suppressierende Effekte besitzen [Roncarolo, 2006]. So gehört zu den Funktionen von TGF- $\beta$  u.a. die Suppression mukosaler, allergenspezifischer T-Zellaktivierung [Akdis, 2004], Vermehrung der Expression von Foxp3 [Mothes, 2003], die Expansion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg [Huber and Schramm, 2006] und die Induktion von IgA-Sekretion in B-Zellen [Platts-Mills, 1976; Georgitis, 1985; Jutel, 2003; Schmidt-Weber and Blaser, 2004]. Eine Bestimmung von TGF- $\beta$  und IgA könnte somit Aufschluss geben, ob diese Faktoren die Rolle von IL-10 und IgG4 im Rahmen der SLIT übernommen haben, da auch sie zur Induktion von mukosaler Toleranz nach SLIT beitragen können. So wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollen

geringere Gesamt-IgA-Konzentrationen [Stokes, 1974; Bahceciler, 2005] und ein relativer Mangel an IgA-Antikörpern im Serum [Benson, 2003] sensibilisierter Kinder und Allergiker gefunden.

Der Einsatz von MHC-Klasse-II-Peptid-Tetrameren könnte zukünftig eine genauere Analyse der  $CD4^+$  T-Zellantwort nach Stimulation mit dem Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1 erlauben [Van Overtvelt, 2008]. Aufgrund der großen interindividuellen Variabilität des humanen Leukozytenantigen-Systems (*Human Leukocyte Antigen*, HLA-System), dem humanen MHC, wäre dieser Therapieansatz allerdings nur ausgewählten Patientengruppen vorbehalten und sehr kostenintensiv.

### **6.3.2. $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ REGULATORISCHE T-ZELLEN**

Anders als die induzierbaren, allergenspezifischen Tr1 stellen die  $Foxp3^+$  Treg eine T-Zellsubpopulation dar, die nach Stimulation zellkontaktabhängig, anstatt zytokinabhängig, Teff supprimieren kann [Jonuleit, 2001; Nakamura, 2001; Ng, 2001] sowie kein bestimmtes Zytokinsekretionsmuster besitzt. Stattdessen können sie über intrazelluläre Marker, wie Foxp3 [Sakaguchi, 1995; Fontenot, 2003; Hori, 2003], oder einer Kombination aus membrangebunden Oberflächenmolekülen ( $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ ) identifiziert werden. CD127 korreliert dabei invers mit Foxp3 [Liu, 2006; Seddiki, 2006], aufgrund der Interaktion zwischen Foxp3 und dem Promotor von CD127 [Liu, 2006]. Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  Treg fassen peripher induzierte iTreg und im Thymus generierte  $Foxp3^+$  nTreg zusammen [Bellinghausen, 2003; Apostolou, 2008; Huehn, 2009].

Derzeit gibt es wenige Studien zur Beobachtung des Frequenzverlaufes von  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg während einer SLIT. In der vorliegenden Arbeit konnten keine wesentlichen Veränderungen des prozentualen Anteils der  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg im ersten Jahr der SLIT festgestellt werden. Es zeigte sich erst nach zwölf Monaten eine steigende Tendenz. Ein ähnlich konstanter Verlauf konnte auch in einer Studie zur SCIT gezeigt werden [Möbs, 2010a], die anhand des gleichen Studienprotokolls den prozentualen Anteil der  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg über ein Jahr SCIT bestimmten. Weitere Studien zeigen ebenfalls keine Veränderungen der  $CD4^+CD25^+$  Treg in

Birkenpollenallergikern nach sechs Monaten [Grindebacke, 2009] und in Hausstaubmilbenallergikern nach einjähriger SIT [Ajduk, 2008]. Außerdem konnten keine Unterschiede der Anzahl der  $CD4^+CD25^+$  Treg von gesunden Probanden und Birkenpollenallergikern festgestellt werden [Bellinghausen, 2003; Grindebacke, 2009].

Ein konstanter prozentualer Anteil spricht allerdings nicht gegen einen Einfluss der SLIT auf die supprimierende Aktivität der  $Foxp3^+$  Zellen. So könnte die SLIT trotz einer gleich bleibenden Zahl zur Steigerung der Suppressionskapazität der  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg führen [Jutel, 2003]. Unterstützt wird diese Hypothese von Beobachtungen, dass in Allergikern ohne SIT eine verminderte Suppressionskapazität der  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg gegenüber allergiefördernder Th2-Proliferation und -zytokinproduktion im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden nachzuweisen war [Grindebacke, 2004; Ling, 2004; Thunberg, 2007]. Während der Pollensaison nimmt die Suppressionsfähigkeit der  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg von Allergikern sogar noch weiter ab, wie Grindebacke et al. und Anderson et al. in ihren Arbeiten beschreiben [Grindebacke, 2004; Anderson, 2009]. Ursache dafür könnten erhöhte Konzentrationen des Th2-Wachstumsfaktors IL-4 nach Allergenkontakt sein. IL-4 ist in der Lage, die supprimierende Fähigkeit der  $CD4^+CD25^+$  Treg zu inhibieren. Das Blockieren von IL-4 könnte somit die supprimierende Aktivität der  $CD4^+CD25^+$  Treg auf die IL-5- und IL-13-Produktion bei Allergikern während der Pollenflugphase wiederherstellen. In der Tat konnte gezeigt werden, dass anti-IL-4-Behandlung die IL-5-Produktion und die Th2-Aktivierung hemmt [Hart, 2002].

Ein weiterer Grund für die gleich bleibende Anzahl der  $CD25^+Foxp3^+$  Treg könnte eine Rekrutierung von allergenspezifischen Treg zu den Effektororganen der allergischen Erkrankung sein [Anderson, 2009]. Radulovic et al. konnten in Biopsien der nasalen Mukosa einen  $CD25^+Foxp3^+$  Treg-Anstieg während der Grasspollenflugsaison nach zwei Jahren SIT durch immunhistochemische Analysen zeigen [Radulovic, 2008]. So könnte also eine unterschiedliche Verteilung der  $Foxp3^+$  Zellen im peripheren Blut und in den Effektororganen einen konstanten Verlauf der  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  Zellen vortäuschen.

Bei Patienten mit Nahrungsmittelallergie konnte hingegen eine Erhöhung der Anzahl der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen nach spontaner Remission festgestellt werden [Karlsson, 2004; Shreffler, 2009]. Dieser Anstieg der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg könnte auf der Untersuchung unterschiedlicher pathophysiologischer Vorgänge (Remission von respiratorischen Allergien durch SIT, von Nahrungsmittelallergien spontan) und auslösender Allergene sowie verschiedener Phänotypen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Treg) beruhen. Da keine eindeutigen Ergebnisse über den Frequenzverlauf der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Treg vorliegen, sind weitere Untersuchungen unter standardisierten Bedingungen notwendig, um die Rolle bei der Toleranzinduktion zu klären.

#### **6.4. EINFLUSS DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE AUF T-HELPER-ZELLEN**

##### **6.4.1. FEHLENDER ANSTIEG DER BET V 1-SPEZIFISCHEN T-HELPER-2-ZELLEN WÄHREND DER BIRKENPOLLENFLUGSAISON UNTER SUBLINGUALER IMMUNTHERAPIE**

Die Ausbildung IgE-vermittelter Allergien ist mit einem immunologischen Ungleichgewicht von allergenspezifischen Th1 und Th2 vergesellschaftet [Ciprandi, 2007]. Th2 dominieren die allergische Immunantwort nach Allergenstimulation und produzieren hauptsächlich IL-4, IL-5 und IL-13 [Romagnani, 2000; Janeway C. A. jr., 2002]. IL-5 ist ein Schlüsselzytokin der eosinophilen Differenzierung und Aktivierung und der späteren Entwicklung von mukosalen Entzündungen bei allergischer Rhinitis und Asthma bronchiale [Durham, 1992]. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der im ELISPOT-Versuch detektierten IL-5<sup>+</sup> *spots* Rückschluss auf die Anzahl der Th2 zu verschiedenen Zeitpunkten über zwölf Monate unter SLIT gezogen werden. Dabei blieben Bet v 1-spezifische Th2-Antworten nach zwölf Monaten SLIT unverändert zum Ausgangswert, im Gegensatz zu anderen Studienergebnissen mit konventioneller SIT, die einen Abfall der allergiespezifischen Th2 nach 50 Tagen bzw. einem Jahr zeigen [Jutel, 1995; Ebner, 1997].

Wird der Verlauf innerhalb eines Jahres betrachtet, konnte bis drei Monate nach Therapiebeginn ein Frequenzanstieg der Bet v 1-spezifischen IL-5-produzierenden Th2 gezeigt werden. Die Erhöhung allergenspezifischer Th2 ist vermutlich auf die kumulative Dosissteigerung unter SLIT zurückzuführen [Moverare, 1998; Benjaponpitak, 1999]. Der Th2-dominierende Phänotyp allergenspezifischer T-Zellen innerhalb der PBMC während der frühen Phase der SLIT wurde auch von anderen Gruppen bestätigt [Moverare, 1998; Benjaponpitak, 1999]. Eine Steigerung der Anzahl an Th2 während natürlicher Allergenexposition zur Pollenflugzeit (M6), wie sie bei symptomatisch therapierten Birkenpollenallergikern beobachtet wird [Möbs, 2010b], blieb unter SLIT aus. Dies steht im Einklang mit der Verbesserung des klinischen Befindens. Obwohl keine deutlichen Veränderungen der Frequenzen der  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  Treg und Tr1 im Therapieverlauf erfasst werden konnten, wie im Kap. 5.2.4. und 5.2.5 bereits beschrieben, könnte eine qualitative Veränderung derSuppressionsaktivität der  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  Zellen zum Ausbleiben des Th2-Anstieges während der Pollenflugphase geführt haben. Eine lokale Expansion von Foxp3<sup>+</sup> Zellen hingegen, z.B. in der Mukosa der Nase, wäre wahrscheinlich nicht ausreichend um einen systemischen Th2-Anstieg zu verhindern. Als eine weitere Ursache für eine fehlende Th2-Erhöhung unter SLIT zur Pollenflugsaison wird die Generierung von blockierenden IgG4-Antikörpern diskutiert (siehe Kap. 6.5.2.).

Nach hochdosierter Antigenbehandlung kann es zu Apoptose kommen, die einer T-Zell-Anergie folgt [Vandenbark, 2000]. Die Arbeitsgruppe um Gardner et al. konnten nach Stimulation von humanen T-Zellen mit hohen Dosen an Hausstaubmilbenextrakt eine erhöhte Apoptoserate der  $CD4^+ IL-4^+$  T-Zellen und T-Zell-Anergie *in vitro* beobachten [Gardner, 2004]. Als T-Zell-Anergie wird eine Verringerung der antigenspezifischen proliferativen Antwort bezeichnet, die durch IL-2 aufgehoben werden kann [Schwartz, 2003]. Auch Savolainen et al. konnten zeigen, dass während einer Hochdosis-SLIT bei Kindern mit allergischer Rhinitis die Expressionslevel von IL-10 stiegen und IL-5-Konzentrationen sanken [Savolainen, 2006]. Daher könnte die Abnahme der antigenspezifischen Th2 nach dem dritten Monat unter SLIT auch durch T-Zell-Anergie mit darauffolgender Apoptose hervorgerufen worden sein.

#### **6.4.2. SPÄTER ANSTIEG BET v 1-SPEZIFISCHER T-HELPER-1-ZELLEN UNTER SUBLINGUALER IMMUNTHERAPIE**

Ob IFN- $\gamma$  eine essentielle Rolle bei der Toleranzinduktion durch eine SLIT spielt, stellen Studien in Frage, die reduzierte allergenspezifische IFN- $\gamma$ -mRNA nach SIT detektierten [O'Brien, 1997] und eine Verstärkung asthmatischer und allergischer Erkrankungen durch Th1-assoziierte Entzündungsreaktionen aufzeigten [Hansen, 1999].

In der vorliegenden Studie konnte hingegen nach zwölf Monaten SLIT ein Frequenzanstieg der Bet v 1-spezifischen Th1 festgestellt werden, was wiederum für einen Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die Toleranzerhaltung sprechen könnte.

So fanden sich nach einjähriger klinisch erfolgreicher Gräserpollenimmuntherapie erhöhte IFN- $\gamma$ -produzierende T-Zellzahlen in Gewebeproben der Nasenschleimhaut 24h nach nasaler Allergenprovokation, die mit einer Inhibition der Infiltration der nasalen Mukosa mit CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und Eosinophilen einherging [Durham, 1996]. Auch Ebner et al. beschrieben in einer Studie mit acht Pollinosis-Patienten einen Anstieg von IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen während einer konventionellen SIT über ein Jahr [Ebner, 1997]. In einer Arbeit von Bohle et al. wurden PBMC u.a. nach Stimulation mit Bet v 1 von neun Birkenpollenallergikern vor, nach vier und nach 52 Wochen SLIT untersucht. Nach vier Wochen fanden sich einerseits reduzierte IFN- $\gamma$ -mRNA-Expressionslevel verglichen mit Werten vor Therapiebeginn. Nach 52 Wochen zeigten sich dagegen erhöhte IFN- $\gamma$ - und reduzierte IL-4-mRNA-Expressionen [Bohle, 2007].

Übereinstimmend dazu zeigen *in vitro*-Daten, dass hohe Allergenkonzentrationen, wie sie den Patienten in der Aufrechterhaltungsphase einer SLIT zugeführt werden, zu erhöhten IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen und zu einer Th2-Anergie durch vermehrte Apoptose von IL4<sup>+</sup> T-Zellen führen können [Gardner, 2004]. Wahrscheinlich führt eine erst zum späteren Zeitpunkt einer SLIT erreichte hohe Allergen-Kumulativedosis zum Anstieg IFN- $\gamma$ -sezernierender allergenspezifischer Th1, und somit zu einem Toleranzmechanismus, der nicht auf der aktiven Suppression durch IL-10-produzierenden Treg beruht [Bohle, 2007].



IFN- $\gamma$  antagonisiert viele physiologische Antworten, die durch IL-4 mediiert werden (z.B. die IL-4-induzierte IgE-Produktion auf Transkriptionsebene [Venkataraman, 1999]), führt zur Induktion einer T-Zell-Anergie und auf molekularer Ebene zu einer Erhöhung der Apoptose von IL-4<sup>+</sup> T-Zellen [Gardner, 2004]. Es wird vermutet, dass IFN- $\gamma$  Gene, wie GZMB (Granzym B), induziert, die zum vermehrten programmierten Th2-Tod führen [Devadas, 2006]. Zusätzlich inhibiert IFN- $\gamma$  die Th2-Differenzierung und -rekrutierung [Elser, 2002] und die Th2-mediierte Immunantwort durch vermehrte Differenzierung naiver T-Zellen zu einem Th1-Phänotyp [Mullen, 2001].

Durch diese Mechanismen könnten die Freisetzung von entzündlichen Th2-Mediatoren reduziert [Teixeira, 2005] und so klinische Symptome unter Allergenexposition, wie bronchiale Hyperreaktivität und bronchoalveolare Eosinophilie, vermindert werden [Huang, 2001].

#### **6.4.3. DAS VERHÄLTNISS VON T-HELPER-2- ZU T-HELPER-1-ZELLEN IM VERLAUF DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE**

Bei der Betrachtung des Verhältnisses aus IL-5- zu IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen zeigte sich initial nach drei Monaten ein leichter Anstieg des Th2 /Th1-Quotienten, der während der Pollenflugzeit nach sechs Monaten wieder auf das Ausgangsniveau absank. Nach zwölf Therapiemonaten kam es zum deutlichen Abfall des Quotienten aus allergenspezifischen Th2 /Th1 unter die Ausgangswerte vor Therapiebeginn. Dies spricht für eine Verschiebung von einer anfänglich Th2-dominierten zur Th1-betonten Immunantwort in der späteren Phase der SLIT (vgl. Kap. 6.4.2.). Auch Benjaponpitak et al. stellten fest, dass sich während der Aufrechterhaltungsphase der SIT die IL-4 /IFN- $\gamma$ -Produktion von Patienten verminderte, die auf die Therapie ansprachen [Benjaponpitak, 1999]. Eine Verschiebung der Th1 /Th2-Balance in Richtung Th2 wird allgemein als entscheidend für die Entwicklung einer Allergie angesehen. In zahlreichen Studien wurde die Rolle des erhöhten Th2 /Th1-Verhältnisses im Pathomechanismus der Allergien beschrieben [Robinson, 1992; Kay, 2001; Wong, 2001]. Van Overtvelt et al. konnten mittels MHC-Klasse-II-Peptid-Tetramer-Färbung zeigen, dass Zellen gesunder Individuen nach Bet v 1-Stimulation hauptsächlich IFN- $\gamma$  oder IL-10 sezernieren,

wohingegen Zellen allergischer Patienten mit IL-5- und kaum detektierbarer IL-10-Sekretion reagieren [Van Overtvelt, 2008]. Das Verhältnis aus Th2 /Th1 ist bei symptomatisch therapierten Birkenpollenallergikern während der Pollenflugsaison durch einen Th2-Anstieg erhöht [Imada, 1995; Gabrielsson, 1997].

Eine Verschiebung der Th2- zur Th1-betonten Immunantwort, wie er auch in dieser Arbeit zu beobachten war, könnte somit eine entscheidende Rolle für die Etablierung einer Allergentoleranz spielen [Durham, 1996; Romagnani, 2006]. Dieser wurde auch in mehreren Studien einer konventionellen SIT [Jutel, 1995; Bellinghausen, 1997; Ebner, 1997; Mamessier, 2006], aber auch bei einer SLIT, gezeigt [Di Rienzo, 2003; Ippoliti, 2003; Bohle, 2007].

## **6.5. HUMORALE VERÄNDERUNGEN UNTER SUBLINGUALER IMMUNTHERAPIE**

Neben zellulären wurden auch humorale Veränderungen über einen Zeitraum von zwölf Monaten untersucht.

### **6.5.1. INITIALER ANSTIEG DES BET V 1-SPEZIFISCHEN IMMUNGLOBULINS E WÄHREND DER SUBLINGUALEN IMMUNTHERAPIE**

Über einen Beobachtungszeitraum von zwölf Monaten unter SLIT konnte sowohl bei der Messung der spezifischen IgE-Konzentrationen gegen Bet v 1 und BPA als auch bei der Bestimmung der IgE-Gesamtkonzentrationen ein initialer Anstieg während der ersten drei Monate mit anschließendem Rückgang während der Pollenflugphase und nach zwölf Monaten ein weiteres Absinken auf Höhe der Ausgangswerte bzw. leicht darunter festgestellt werden.

Der anfängliche Anstieg der Produktion allergenspezifischer IgE-Antikörper im Serum der vorliegenden Studienpatienten kann auf eine vermehrte Allergenzufuhr unter Immuntherapie zurückzuführen sein. Das anschließende Ausbleiben eines weiteren Anstieges während der Pollensaison spricht für eine verminderte Immunantwort und steht höchstwahrscheinlich mit den

gesteigerten IgG4-Konzentrationen (vgl. Kap. 6.5.2.) unter SLIT in Zusammenhang.

Obwohl sich der frühe Anstieg der allergenspezifischen Serum-IgE-Konzentrationen in etlichen Studien als charakteristisches Merkmal bei SLIT mit Pollenallergenen erwies [Marcucci, 2005; Durham, 2006; Aberer, 2007; Didier, 2007; Scadding and Durham, 2009], zeigten andere Arbeiten mit HSM-Allergikern keine Veränderungen der spezifischen IgE-Konzentrationen unter SLIT [Mungan, 1999; Pajno, 2000; Marcucci, 2003; Mortemousque, 2003; Arikan, 2004; Lue, 2006; Niu, 2006]. Eine Ursache für die verschiedenen Verläufe können einerseits Expositionsunterschiede von ganzjährig relativ konstanter Belastung (bei HSM-Allergikern) im Gegensatz zu saisonalen, natürlich bedingtem Anstieg der Allergene und andererseits die unterschiedlichen Blutentnahmezeitpunkte in den Studien sein. Eine Verringerung der Gesamt-IgE-Serum-Werte nach dreijähriger SLIT zeigte die Arbeitsgruppe um Ozdemir [Ozdemir, 2007]. Das deutet darauf hin, dass Langzeittherapien notwendig sind, um relevante längerfristige Veränderungen der IgE-Produktion festzustellen.

### **6.5.2. BET V 1-SPEZIFISCHES IMMUNGLOBULIN G4**

Parallel zum IgE, wurde ein Anstieg der Konzentrationen von Bet v 1-spezifischen IgG4 während der Pollenflugzeit nach sechs Monaten SLIT beobachtet. Allerdings waren nach zwölf Monaten die Bet v 1-spezifischen IgG4 Konzentrationen im Vergleich zu Ausgangswerten weiterhin leicht erhöht. Andere Arbeiten berichten ebenfalls über einen Anstieg der IgG und IgG4-Konzentrationen unter Hyposensibilisierungstherapien [Devey, 1976; Peng, 1992; Gehlhar, 1999; Nouri-Aria, 2004; Antunez, 2008]. Diese Ergebnisse könnten für die Existenz von langlebigen Plasmazellen sprechen [Radbruch, 2006], die Teil des immunologischen Gedächtnisses sind und der Aufrechterhaltung allergenspezifischer Antikörperproduktion durch andauernde Sekretion und ihr langes Überleben dienen [Radbruch, 2006].

In welchem Maße IgG4 an einer protektiven Wirkung allergenspezifischer SIT-induzierter IgG-Antikörper beteiligt ist, ist Gegenstand aktueller Forschung. Pilette et al. konnten zeigen, dass hauptsächlich IgG-Antikörper der Subklasse

IgG4 für die gegen Allergene induzierte blockierende Aktivität verantwortlich sind [Pilette, 2007]. In funktionellen Experimenten wurde gezeigt, dass IgG4-depletierte Seren die Bindung von Allergen /IgE-Komplexen an B-Zellen weniger stark inhibierten als isolierte IgG4-Fraktionen oder Gesamt-IgG-enthaltende Seren von Patienten nach erfolgreicher SIT. Jedoch gingen die Anstiege von IgG, besonders der IgG4-Subklasse, nicht immer mit einer Verbesserung der allergischen Erkrankung einher [Birkner, 1990; Bodtger, 2005]. Daher wurde angenommen, dass die blockierende Aktivität von IgG nicht isotypabhängig, sondern epitopspezifisch ist. Unterstützt wurde diese Hypothese durch eine Studie von Visco et al., in der allergenspezifische monoklonale IgG1-Antikörper die Bindung zwischen Bet v 1 und IgE-Antikörpern verhinderten, während monoklonale IgG4-Antikörper, die an ein anderes Epitop banden, die IgE-Bindung förderten [Visco, 1996].

Lessoif et al. konnten eine schützende Wirkung von IgG-Antikörpern nachweisen, indem sie bei Bienengiftallergikern, die aus Plasma von Bienenzüchtern isolierte Immunglobuline erhielten, eine Bienengifttoleranz induzieren konnten [Lessoif, 1978]. Es wird vermutet, dass allergenspezifisches IgG eine blockierende Funktion besitzt, die sich darin äußert, dass das Allergen vor der Bindung an Effektorzell-gebundene IgE-Antikörper abgefangen wird [Ejrnaes, 2004]. Auf diese Weise wird die IgE-mediierte Freisetzung inflammatorischer Zytokine aus Mastzellen und Basophilen verhindert [Mothes and Valenta, 2004]. In Mausmodellen konnte demonstriert werden, dass blockierendes IgG4, das während einer Immunantwort produziert oder passiv injiziert wurde, die IgE-mediierte Überempfindlichkeit durch ein FcγRIIb (CD16)-abhängiges „Abfangen“ supprimiert [Strait, 2006]. CD16 wird von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen exprimiert und dient zur Erkennung von zirkulierenden Immunkomplexen.

In mukosalen Sekreten wurden besonders hohe Konzentrationen an IgG-Molekülen gefunden [Aghayan-Ugurluoglu, 2000]. Das könnte dafür sprechen, dass es unter einer SIT mit Aeroallergenen zu einer Ansammlung blockierender IgG-Antikörper in Effektororganen kommt, die zur Neutralisation von eindringenden Allergenen und Verhinderung der Entstehung von Entzündungsreaktionen führen. Außerdem könnten IgG-Antikörper einerseits durch Herunterregulation der IgE-erleichterten Allergenpräsentation an T-

Zellen, andererseits durch eine Verhinderung der Aktivierung der Eosinophilen, die Spät-Phase-Symptome einer Allergie mindern [van Neerven, 1999]. Somit wären sie entscheidend an einer erfolgreichen Toleranzinduktion beteiligt [Nouri-Aria, 2004; Wachholz and Durham, 2004].

Bei Arbeiten, die unter den gleichen wie den hier experimentell angewandten Bedingungen durchgeführt wurden [Möbs, 2010b], zeigten symptomatisch therapierte Birkenpollenallergiker sowie gesunde Kontrollpatienten im Unterschied zu SIT-Behandelten keine erhöhte IgG4-Serumkonzentration während der Pollensaison. Diese Ergebnisse sprechen für eine entscheidende Rolle der IgG4-Antikörper bei der Toleranzinduktion durch die SLIT.

Eine steigende Konzentration anderer allergenspezifischer Subklassen von IgG, wie IgG1 und IgG2, unter SCIT konnten Reisinger et al. und die Arbeitsgruppe um Mothes darstellen [Mothes, 2003; Reisinger, 2005].

Da eine SIT mit Aeroallergenen keine signifikante Veränderung der IgG-Bindungsfähigkeit hervorruft [Svenson, 2003; Ejrnaes, 2004; Bodtger, 2005], ist das Ausmaß der blockierenden Aktivität von IgG4 wahrscheinlich von deren quantitativen Zunahme abhängig, und nicht von einer speziellen intrinsischen Aktivität. Dies lässt sich am besten anhand des sinkenden IgE/IgG- bzw. IgE/IgG4-Quotienten ausdrücken [Lima, 2002; van Neerven, 2004; Keskin, 2006]. Auch in der vorliegenden Studie konnte ein Absinken des Verhältnisses zwischen allergenspezifischem IgE und IgG4 durch einen überproportionalen Anstieg der Bet v 1-spezifischen IgG4-Antikörper über zwölf Monate unter SLIT beobachtet werden. Die Ergebnisse sprechen somit dafür, dass IgG4 die IgE-medierte Immunreaktion supprimiert und sowohl die Freisetzung der entzündlichen Mediatoren aus Basophilen und Mastzellen, als auch die IgE-gesteuerte Allergenpräsentation an T-Zellen inhibieren kann. Für eine bessere individuelle Kontrolle und als ein eventuell prädiktiver Wert über den Erfolg einer Immuntherapie könnte dieser Parameter zukünftig an Bedeutung gewinnen.

### **6.5.3. BEZIEHUNG ZWISCHEN KLINISCHER SYMPTOMATIK UND INDUKTION VON BIRKENPOLLENALLERGEN-SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN UNTER SUBLINGUALER IMMUNOTHERAPIE**

Mit Ausnahme eines Patienten waren bei allen in diese Studie eingeschlossenen Patienten, die eine objektive klinische Verbesserung im Hautpricktest zeigten, während der Pollenflugzeit gestiegene BPA-spezifische IgG4-Antikörperkonzentrationen im Serum nachweisbar. Dieser Zusammenhang zwischen steigenden BPA-spezifischen IgG4-Werten und verbesserter klinischer Beschwerdesymptomatik konnte auch in anderen Studien gezeigt werden [Flicker and Valenta, 2003; Wachholz and Durham, 2004].

Zusätzlich fand sich bei vier von sechs Patienten eine wechselseitige Beziehung zwischen dem Abfall von Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörpern nach einem Jahr SLIT und der verminderten Hautreaktivität im Pricktest.

### **6.6. INTERPRETATION DER VERSCHIEDENEN MECHANISMEN WÄHREND DER UNTERSCHIEDLICHEN PHASEN UNTER SUBLINGUALER IMMUNOTHERAPIE**

Die vorliegende Arbeit macht deutlich, dass verschiedene immunregulatorische Faktoren an einer allergenspezifischen Toleranzinduktion während einer SLIT beteiligt sind. Entsprechend einer konventionellen SCIT kommt es auf humoraler Ebene zum Anstieg spezifischer IgG4-Antikörper und einem Abfall des allergenspezifischen IgE/IgG4-Verhältnisses. Die zelluläre Immunantwort ist durch eine kurzzeitige in der Frühphase der SLIT auftretende Induktion von IL-10-produzierenden Tr1 bei vier von sechs Patienten [Bohle, 2007] und in einigen Fällen durch eine Vermehrung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg gekennzeichnet [Nelson, 2004; Sun, 2008]. Außerdem zeigt sich im Verlauf der Therapie durch eine gesteigerte IFN- $\gamma$ -Produktion einhergehend mit einem abfallenden Th2/Th1-Quotienten eine Verschiebung der initial Th2- zu einer Th1-beherrschenden Immunantwort. Welche Wechselwirkungen die in dieser Studie beobachteten zellulären und humoralen Veränderungen aufeinander ausüben, soll im Folgenden diskutiert werden.

Die Produktion von IgE und IgG4 wird durch die Th2-assoziierten Zytokine, IL-4 und IL-13 induziert [Lundgren, 1989; Punnonen, 1993]. Daher ist von einem parallelen Verlauf von Th2 und den spezifischen IgE-Antikörpern auszugehen. In der vorliegenden Arbeit ist diese wechselseitige Beziehung zu erkennen. Die Zunahme der IL-5<sup>+</sup> spots nach drei Monaten unter SLIT scheint mit einem Anstieg der IgE-Antikörper einher zu gehen. Jedoch gibt es in der Literatur widersprüchliche Studien, die einerseits über leichte Abnahmen [Cosmi, 2006] und andererseits über konstante Verläufe der IgE-Konzentrationen berichten. Langlebige IgE-produzierende Plasmazellen im Knochenmark könnten eine Erklärung für die Aufrechterhaltung der IgE-Sekretion bieten [Radbruch, 2006]. Der tendenzielle Anstieg von IgG4-Antikörpern könnte durch SLIT-induzierte Tr1 oder CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg hervorgerufen worden sein, die anschließend die Antikörperproduktion durch B-Zellen modifiziert haben können [Meiler, 2008; Satoguina, 2008]. Durch IL-10 könnte es zu einer verminderten Produktion von IgE-Antikörpern und einer gesteigerten IgG4-Sekretion kommen (IL-4 hingegen führt zu erhöhten IgE- und IgG4-Konzentrationen; siehe oben). Da es trotz des Ausbleibens einer Induktion von allergenspezifischen Tr1 oder CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg in der vorliegenden Studie zu einem Anstieg von IgG4 kommt, müssen allerdings noch andere Zellen eine Rolle spielen. Zum einen könnten lokale induzierte Tregs gebildet worden sein, bspw. in der nasalen Mukosa, die dort eine gewebständige IgG-Produktion induzieren können. Zum anderen können auch B-Zellen, Monozyten oder Makrophagen als Produzenten für IL-10 fungieren [Akdis, 1998; Francis, 2003; Nouri-Aria, 2004].

Weiterhin kann spekuliert werden, dass es dosis- und zeitabhängig zum Vorherrschen verschiedener Mechanismen der Toleranzinduktion kommt. So zeigen einige Studien, dass geringe Dosen eines oral zugeführten Antigens zu aktiver Suppression führen, wohingegen hohe Allergendosen klonale Deletion oder Anergie unterstützen [Chen, 1995]. Die Stimulation humaner T-Zellen mit hohen Dosen von Allergenextrakt führte dabei zur Vermehrung IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen oder zur Apoptose von CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> T-Zellen und T-Zell-Anergie *in vitro* [Gardner, 2004].

Im weiteren Verlauf der SLIT könnten die kumulativen, hohen Dosen an Allergen entsprechend die Induktion von Deletion/Anergie unterstützt und zu

einer abgeschwächten Immunantwort der allergenspezifischen IL-5-produzierenden Zellen, besonders während der Pollenflugphase, geführt haben. Für eine Th1-dominierte Population in der Erhaltungsphase nach zwölfmonatiger SLIT sprechen einerseits der Abfall des Th2/Th1-Quotienten und andererseits die gesteigerte Produktion an IFN- $\gamma$ . Die erwähnte Immundeviation von einer Th2- zu einer Th1-dominierten Immunantwort unter der SLIT beschreiben auch viele andere Autoren [Romagnani, 2006; Bohle, 2007; Xiao, 2010].

Zusammengefasst lässt sich aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sagen, dass verschiedene zelluläre und humorale Faktoren an der Toleranzinduktion zu verschiedenen Zeitpunkten der SLIT beteiligt sind. Die SLIT führt zu einer IgG4-Induktion einhergehend mit einer Abnahme des IgE/IgG4-Quotienten und einer allergenspezifischen T-Zelltoleranz. Die Immunmechanismen der SLIT-vermittelten Toleranzinduktion stellen somit ein dynamisches Geschehen dar, die durch ein Zusammenspiel zellulärer und humoraler Faktoren klinische Allergentoleranz zur Folge haben.



## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Aalberse, R. C., R. van der Gaag and J. van Leeuwen (1983). "Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response." *J Immunol* 130(2): 722-6.
- Aberer, W., T. Hawranek, N. Reider, C. Schuster, G. Sturm and B. Kranke (2007). "Immunoglobulin E and G antibody profiles to grass pollen allergens during a short course of sublingual immunotherapy." *J Investig Allergol Clin Immunol* 17(3): 131-6.
- Aghayan-Ugurluoglu, R., T. Ball, S. Vrtala, C. Schweiger, D. Kraft and R. Valenta (2000). "Dissociation of allergen-specific IgE and IgA responses in sera and tears of pollen-allergic patients: a study performed with purified recombinant pollen allergens." *J Allergy Clin Immunol* 105(4): 803-13.
- Ajduk, J., I. Marinic, N. Aberle, S. Rabatic and A. Gagro (2008). "Effect of house dust mite immunotherapy on transforming growth factor beta1-producing T cells in asthmatic children." *Ann Allergy Asthma Immunol* 100(4): 314-22.
- Akdis, C. A., M. Akdis, T. Blesken, D. Wymann, S. S. Alkan, U. Muller and K. Blaser (1996). "Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro." *J Clin Invest* 98(7): 1676-83.
- Akdis, C. A., T. Blesken, M. Akdis, B. Wuthrich and K. Blaser (1998). "Role of interleukin 10 in specific immunotherapy." *J Clin Invest* 102(1): 98-106.
- Akdis, M. and C. A. Akdis (2007). "Mechanisms of allergen-specific immunotherapy." *J Allergy Clin Immunol* 119(4): 780-91.
- Akdis, M. and C. A. Akdis (2009). "Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease." *Nat Rev Drug Discov* 8(8): 645-60.
- Akdis, M., K. Blaser and C. A. Akdis (2005). "T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases." *J Allergy Clin Immunol* 116(5): 961-8; quiz 969.
- Akdis, M., J. Verhagen, A. Taylor, F. Karamloo, C. Karagiannidis, R. Cramer, S. Thunberg, G. Deniz, R. Valenta, H. Fiebig, C. Kegel, R. Disch, C. B. Schmidt-Weber, K. Blaser and C. A. Akdis (2004). "Immune responses in

- healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells." *J Exp Med* 199(11): 1567-75.
- Akoun, H., A. Tsicopoulos, H. Vorng, B. Wallaert, J. P. Dessaint, M. Joseph, Q. Hamid and A. B. Tonnel (1996). "Venom immunotherapy modulates interleukin-4 and interferon-gamma messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes." *Immunology* 87(4): 593-8.
- Anderson, A. E., K. J. Mackerness, M. Aizen, V. A. Carr, D. Nguyen, F. Du Pre, S. R. Durham and D. S. Robinson (2009). "Seasonal changes in suppressive capacity of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells from patients with hayfever are allergen-specific and may result in part from expansion of effector T cells among the CD25<sup>+</sup> population." *Clin Exp Allergy* 39(11): 1693-9.
- Anhoej, C., V. Backer and H. Nolte (2001). "Diagnostic evaluation of grass- and birch-allergic patients with oral allergy syndrome." *Allergy* 56(6): 548-52.
- Antunez, C., C. Mayorga, J. L. Corzo, A. Jurado and M. J. Torres (2008). "Two year follow-up of immunological response in mite-allergic children treated with sublingual immunotherapy. Comparison with subcutaneous administration." *Pediatr Allergy Immunol* 19(3): 210-8.
- Apostolou, I., P. Verginis, K. Kretschmer, J. Polansky, J. Huhn and H. von Boehmer (2008). "Peripherally induced Treg: mode, stability, and role in specific tolerance." *J Clin Immunol* 28(6): 619-24.
- Arbes, S. J., P. J. Gergen, L. Elliott and D. C. Zeldin (2005). "Prevalences of positive skin test responses to 10 common allergens in the US population: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116(2): 377-383.
- Ariano, R., R. C. Panzani and G. Augeri (1998). "Efficacy and safety of oral immunotherapy in respiratory allergy to *Parietaria judaica* pollen. A double-blind study." *J Investig Allergol Clin Immunol* 8(3): 155-60.
- Arikan, C., N. N. Bahceciler, G. Deniz, M. Akdis, T. Akkoc, C. A. Akdis and I. B. Barlan (2004). "Bacillus Calmette-Guerin-induced interleukin-12 did not additionally improve clinical and immunologic parameters in asthmatic children treated with sublingual immunotherapy." *Clin Exp Allergy* 34(3): 398-405.

- Aubier, M., F. Neukirch and I. Annesi-Maesano (2005). "Epidemiology of asthma and allergies. The prevalence of allergies increases worldwide, and asthma has reached his highest-ever prevalence in Europe : why ?" *Bulletin De L Academie Nationale De Medecine* 189(7): 1419-1434.
- Bacchetta, R., C. Sartirana, M. K. Levings, C. Bordignon, S. Narula and M. G. Roncarolo (2002). "Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines." *Eur J Immunol* 32(8): 2237-45.
- Bahceciler, N. N., C. Arkan, A. Taylor, M. Akdis, K. Blaser, I. B. Barlan and C. A. Akdis (2005). "Impact of sublingual immunotherapy on specific antibody levels in asthmatic children allergic to house dust mites." *Int Arch Allergy Immunol* 136(3): 287-94.
- Banham, A. H. (2006). "Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells." *Trends Immunol* 27(12): 541-4.
- Basinski, T. M., D. Holzmann, T. Eiwegger, M. Zimmermann, S. Klunker, N. Meyer, P. Schmid-Grendelmeier, M. Jutel and C. A. Akdis (2009). "Dual nature of T cell-epithelium interaction in chronic rhinosinusitis." *J Allergy Clin Immunol* 124(1): 74-80 e1-8.
- Belladonna, M. L., C. Orabona, U. Grohmann and P. Puccetti (2009). "TGF-[beta] and kynurenines as the key to infectious tolerance." *Trends in Molecular Medicine* 15(2): 41-49.
- Bellinghausen, I., B. Klostermann, J. Knop and J. Saloga (2003). "Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production." *J Allergy Clin Immunol* 111(4): 862-8.
- Bellinghausen, I., G. Metz, A. H. Enk, S. Christmann, J. Knop and J. Saloga (1997). "Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects." *Eur J Immunol* 27(5): 1131-9.
- Benjaponpitak, S., A. Oro, P. Maguire, V. Marinkovich, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (1999). "The kinetics of change in cytokine production by CD4 T cells during conventional allergen immunotherapy." *J Allergy Clin Immunol* 103(3 Pt 1): 468-75.

- Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." *Nat Genet* 27(1): 20-1.
- Benson, M., J. Reinholdt and L. O. Cardell (2003). "Allergen-reactive antibodies are found in nasal fluids from patients with birch pollen-induced intermittent allergic rhinitis, but not in healthy controls." *Allergy* 58(5): 386-92.
- Bettelli, E., M. Dastrange and M. Oukka (2005). "Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(14): 5138-43.
- Birkner, T., H. Rumpold, E. Jarolim, H. Ebner, M. Breitenbach, F. Skvaril, O. Scheiner and D. Kraft (1990). "Evaluation of immunotherapy-induced changes in specific IgE, IgG and IgG subclasses in birch pollen allergic patients by means of immunoblotting. Correlation with clinical response." *Allergy* 45(6): 418-26.
- Bloemen, K., S. Verstraelen, R. Van Den Heuvel, H. Witters, I. Nelissen and G. Schoeters (2007). "The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung." *Immunol Lett* 113(1): 6-18.
- Bodtger, U., A. M. Ejrnaes, L. Hummelshoj, H. H. Jacobi, L. K. Poulsen and M. Svenson (2005). "Is immunotherapy-induced birch-pollen-specific IgG4 a marker for decreased allergen-specific sensitivity?" *Int Arch Allergy Immunol* 136(4): 340-6.
- Bohle, B., T. Kinaciyan, M. Gerstmayr, A. Radakovics, B. Jahn-Schmid and C. Ebner (2007). "Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation." *J Allergy Clin Immunol* 120(3): 707-13.
- Bottema, R. W. B., M. Kerkhof, N. E. Reijmerink, G. H. Koppelman, C. Thijs, F. F. Stelma, H. A. Smit, B. Brunekreef, C. P. Van Schayck and D. S. Postma (2009). "X-chromosome Forkhead Box P3 polymorphisms associate with atopy in girls in three Dutch birth cohorts." *Allergy* 65(7): 865-874.
- Bousquet, J., W. Czarlewski, J. Cougnard, M. Danzig and F. B. Michel (1998). "Changes in skin-test reactivity do not correlate with clinical efficacy of H1-blockers in seasonal allergic rhinitis." *Allergy* 53(6): 579-85.

- Bousquet, J., P. Demoly and F. B. Michel (2001). "Specific immunotherapy in rhinitis and asthma." *Ann Allergy Asthma Immunol* 87(1 Suppl 1): 38-42.
- Bousquet, J., R. Lockey and H. J. Malling (1998). "Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper." *J Allergy Clin Immunol* 102(4 Pt 1): 558-62.
- Bousquet, J., P. Scheinmann, M. T. Guinépain, M. Perrin-Fayolle, J. Sauvaget, A. B. Tonnel, G. Pauli, D. Caillaud, R. Dubost, F. Leynadier, D. Vervloet, D. Herman, S. Galvain and C. Andre (1999). "Sublingual-swallow immunotherapy (SLIT) in patients with asthma due to house-dust mites: a double-blind, placebo-controlled study." *Allergy* 54(3): 249-60.
- Braun-Fahrlander, C., J. Riedler, U. Herz, W. Eder, M. Waser, L. Grize, S. Maisch, D. Carr, F. Gerlach, A. Bufe, R. P. Lauener, R. Schierl, H. Renz, D. Nowak and E. von Mutius (2002). "Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children." *N Engl J Med* 347(12): 869-77.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler and F. Ramsdell (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." *Nat Genet* 27(1): 68-73.
- Burgler, S., N. Ouaked, C. Bassin, T. M. Basinski, P. Y. Mantel, K. Siegmund, N. Meyer, C. A. Akdis and C. B. Schmidt-Weber (2009). "Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells." *J Allergy Clin Immunol* 123(3): 588-95, 595 e1-7.
- Calamita, Z., H. Saconato, A. B. Pela and A. N. Atallah (2006). "Efficacy of sublingual immunotherapy in asthma: systematic review of randomized-clinical trials using the Cochrane Collaboration method." *Allergy* 61(10): 1162-72.
- Calderon, M. and M. Essendrop (2006). "Specific immunotherapy with high dose SO standardized grass allergen tablets was safe and well tolerated." *J Investig Allergol Clin Immunol* 16(6): 338-44.
- Campbell, D. J. and S. F. Ziegler (2007). "FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells." *Nat Rev Immunol* 7(4): 305-10.

- Canonica, G. W. and G. Passalacqua (2003). "Noninjection routes for immunotherapy." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111(3): 437-448.
- Carson, B. D. and S. F. Ziegler (2007). "Impaired T cell receptor signaling in Foxp3<sup>+</sup> CD4 T cells." *Ann N Y Acad Sci* 1103: 167-78.
- Cazac, B. B. and J. Roes (2000). "TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo." *Immunity* 13(4): 443-51.
- Celedon, J. C., R. J. Wright, A. A. Litonjua, D. Sredl, L. Ryan, S. T. Weiss and D. R. Gold (2003). "Day care attendance in early life, maternal history of asthma, and asthma at the age of 6 years." *Am J Respir Crit Care Med* 167(9): 1239-43.
- Challacombe, S. J. and T. B. Tomasi, Jr. (1980). "Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization." *J Exp Med* 152(6): 1459-72.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl (2003). "Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." *J Exp Med* 198(12): 1875-86.
- Chen, Y., J. Inobe, R. Marks, P. Gonnella, V. K. Kuchroo and H. L. Weiner (1995). "Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance." *Nature* 376(6536): 177-80.
- Ciprandi, G., D. Fenoglio, I. Cirillo, M. A. Tosca, M. La Rosa, A. Licari, A. Marseglia, S. Barberi and G. L. Marseglia (2007). "Sublingual immunotherapy: an update on immunologic and functional effects." *Allergy Asthma Proc* 28(1): 40-3.
- Clavel, R., J. Bousquet and C. Andre (1998). "Clinical efficacy of sublingual-swallow immunotherapy: a double-blind, placebo-controlled trial of a standardized five-grass-pollen extract in rhinitis." *Allergy* 53(5): 493-8.
- Coca, A. C., RA (1923). "On the classification of phenomena of hypersensitiveness." *J Immunology* 8: 163.
- Compalati, E., G. Passalacqua, M. Bonini and G. W. Canonica (2009). "The efficacy of sublingual immunotherapy for house dust mites respiratory allergy: results of a GA2LEN meta-analysis." *Allergy* 64(11): 1570-9.
- Coombs, R. R. A. G., P.G.H (1963). *Clinical aspects of immunology* Philadelphia: Davis.

- Cosmi, L., V. Santarasci, R. Angeli, F. Liotta, L. Maggi, F. Frosali, O. Rossi, P. Falagiani, G. Riva, S. Romagnani, F. Annunziato and E. Maggi (2006). "Sublingual immunotherapy with Dermatophagoides monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon-gamma- and interleukin-10-production." *Clin Exp Allergy* 36(3): 261-72.
- Curotto de Lafaille, M. A., N. Kutchukhidze, S. Shen, Y. Ding, H. Yee and J. J. Lafaille (2008). "Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and - independent control of allergic inflammation." *Immunity* 29(1): 114-26.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2009). "Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" *Immunity* 30(5): 626-35.
- Czerkinsky, C., G. Andersson, H. P. Ekre, L. A. Nilsson, L. Klareskog and O. Ouchterlony (1988). "Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells." *J Immunol Methods* 110(1): 29-36.
- D'Amato, G., L. Cecchi, S. Bonini, C. Nunes, I. Annesi-Maesano, H. Behrendt, G. Liccardi, T. Popov and P. Van Cauwenberge (2007). "Allergenic pollen and pollen allergy in Europe." *Allergy* 62(9): 976-990.
- de Waal Malefyt, R., J. Haanen, H. Spits, M. G. Roncarolo, A. te Velde, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel and J. E. de Vries (1991). "Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression." *J Exp Med* 174(4): 915-24.
- Debarry, J., H. Garn, A. Hanuszkiewicz, N. Dickgreber, N. Blumer, E. von Mutius, A. Bufe, S. Gattermann, H. Renz, O. Holst and H. Heine (2007). "Acinetobacter lwoffii and Lactococcus lactis strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties." *J Allergy Clin Immunol* 119(6): 1514-21.
- Devadas, S., J. Das, C. Liu, L. Zhang, A. I. Roberts, Z. Pan, P. A. Moore, G. Das and Y. Shi (2006). "Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells." *Immunity* 25(2): 237-47.

- Devey, M. E., D. V. Wilson and A. W. Wheeler (1976). "The IgG subclasses of antibodies to grass pollen allergens produced in hay fever patients during hyposensitization." *Clin Allergy* 6(3): 227-36.
- Di Rienzo, V., F. Marcucci, P. Puccinelli, S. Parmiani, F. Frati, L. Sensi, G. W. Canonica and G. Passalacqua (2003). "Long-lasting effect of sublingual immunotherapy in children with asthma due to house dust mite: a 10-year prospective study." *Clin Exp Allergy* 33(2): 206-10.
- Didier, A., H. J. Malling, M. Worm, F. Horak, S. Jager, A. Montagut, C. Andre, O. de Beaumont and M. Melac (2007). "Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis." *J Allergy Clin Immunol* 120(6): 1338-45.
- Dieckmann, D., C. H. Bruett, H. Ploettner, M. B. Lutz and G. Schuler (2002). "Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]." *J Exp Med* 196(2): 247-53.
- Drachenberg, K. J., E. Urban, S. Proll and S. R. Woroniecki (2004). "Sublingual specific immunotherapy for adults and children: a post-marketing surveillance study." *Allergol Immunopathol (Madr)* 32(2): 76-81.
- Durham, S. R., S. M. Walker, E. M. Varga, M. R. Jacobson, F. O'Brien, W. Noble, S. J. Till, Q. A. Hamid and K. T. Nouri-Aria (1999). "Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy." *N Engl J Med* 341(7): 468-75.
- Durham, S. R., W. H. Yang, M. R. Pedersen, N. Johansen and S. Rak (2006). "Sublingual immunotherapy with once-daily grass allergen tablets: a randomized controlled trial in seasonal allergic rhinoconjunctivitis." *J Allergy Clin Immunol* 117(4): 802-9.
- Durham, S. R., S. Ying, V. A. Varney, M. R. Jacobson, R. M. Sudderick, I. S. Mackay, A. B. Kay and Q. A. Hamid (1992). "Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia." *J Immunol* 148(8): 2390-4.
- Durham, S. R., S. Ying, V. A. Varney, M. R. Jacobson, R. M. Sudderick, I. S. Mackay, A. B. Kay and Q. A. Hamid (1996). "Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils



- in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma." *J Allergy Clin Immunol* 97(6): 1356-65.
- Ebner, C., U. Siemann, B. Bohle, M. Willheim, U. Wiedermann, S. Schenk, F. Klotz, H. Ebner, D. Kraft and O. Scheiner (1997). "Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen." *Clin Exp Allergy* 27(9): 1007-15.
- Ejrnaes, A. M., U. Bodtger, J. N. Larsen and M. Svenson (2004). "The blocking activity of birch pollen-specific immunotherapy-induced IgG4 is not qualitatively superior to that of other IgG subclasses." *Mol Immunol* 41(5): 471-8.
- Elias, J. A. (2000). "Airway remodeling in asthma. Unanswered questions." *Am J Respir Crit Care Med* 161(3 Pt 2): S168-71.
- Elkord, E. (2009). "Frequency of human T regulatory cells in peripheral blood is significantly reduced by cryopreservation." *J Immunol Methods* 347(1-2): 87-90.
- Elser, B., M. Lohoff, S. Kock, M. Giaisi, S. Kirchhoff, P. H. Krammer and M. Li-Weber (2002). "IFN-gamma represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2." *Immunity* 17(6): 703-12.
- Eng, P. A., M. Borer-Reinhold, I. A. Heijnen and H. P. Gnehm (2006). "Twelve-year follow-up after discontinuation of preseasonal grass pollen immunotherapy in childhood." *Allergy* 61(2): 198-201.
- Eng, P. A., M. Reinhold and H. P. Gnehm (2002). "Long-term efficacy of preseasonal grass pollen immunotherapy in children." *Allergy* 57(4): 306-12.
- Estes, D. M., A. Hirano, V. T. Heussler, D. A. Dobbelaere and W. C. Brown (1995). "Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro." *Cell Immunol* 163(2): 268-79.
- Fanta, C., B. Bohle, W. Hirt, U. Siemann, F. Horak, D. Kraft, H. Ebner and C. Ebner (1999). "Systemic immunological changes induced by administration of grass pollen allergens via the oral mucosa during sublingual immunotherapy." *Int Arch Allergy Immunol* 120(3): 218-24.

- Faria, A. M. and H. L. Weiner (2005). "Oral tolerance." *Immunol Rev* 206: 232-59.
- Feijen, M., J. Gerritsen and D. S. Postma (2000). "Genetics of allergic disease." *Br Med Bull* 56(4): 894-907.
- Finotto, S., M. F. Neurath, J. N. Glickman, S. Qin, H. A. Lehr, F. H. Green, K. Ackerman, K. Haley, P. R. Galle, S. J. Szabo, J. M. Drazen, G. T. De Sanctis and L. H. Glimcher (2002). "Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet." *Science* 295(5553): 336-8.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond and T. R. Mosmann (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." *J Exp Med* 170(6): 2081-95.
- Flicker, S., P. Steinberger, L. Norderhaug, W. R. Sperr, Y. Majlesi, P. Valent, D. Kraft and R. Valenta (2002). "Conversion of grass pollen allergen-specific human IgE into a protective IgG(1) antibody." *Eur J Immunol* 32(8): 2156-62.
- Flicker, S. and R. Valenta (2003). "Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy." *Int Arch Allergy Immunol* 132(1): 13-24.
- Fontenot, J. D., J. L. Dooley, A. G. Farr and A. Y. Rudensky (2005). "Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny." *J Exp Med* 202(7): 901-6.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* 4(4): 330-6.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2005). "A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells." *Nat Immunol* 6(11): 1142-51.
- Francis, J. N., S. J. Till and S. R. Durham (2003). "Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy." *J Allergy Clin Immunol* 111(6): 1255-61.
- Furin, M. J., P. S. Norman, P. S. Creticos, D. Proud, A. Kagey-Sobotka, L. M. Lichtenstein and R. M. Naclerio (1991). "Immunotherapy decreases antigen-induced eosinophil cell migration into the nasal cavity." *J Allergy Clin Immunol* 88(1): 27-32.

- Gabrielsson, S., S. Paulie, A. Roquet, E. Ihre, E. Lagging, M. van Hage-Hamsten, B. Harfast and M. Troye-Blomberg (1997). "Increased allergen-specific Th2 responses in vitro in atopic subjects receiving subclinical allergen challenge." *Allergy* 52(8): 860-5.
- Garcia, B. E., M. L. Sanz, J. J. Gato, J. Fernandez and A. Oehling (1993). "IgG4 blocking effect on the release of antigen-specific histamine." *J Investig Allergol Clin Immunol* 3(1): 26-33.
- Gardner, L. M., R. E. O'Hehir and J. M. Rolland (2004). "High dose allergen stimulation of T cells from house dust mite-allergic subjects induces expansion of IFN-gamma+ T Cells, apoptosis of CD4+IL-4+ T cells and T cell anergy." *Int Arch Allergy Immunol* 133(1): 1-13.
- Gehlhhar, K., M. Schlaak, W. Becker and A. Bufe (1999). "Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome." *Clin Exp Allergy* 29(4): 497-506.
- Georgitis, J. W., J. A. Nickelsen, J. I. Wypych, J. H. Kane and R. E. Reisman (1985). "Local nasal immunotherapy: efficacy of low-dose aqueous ragweed extract." *J Allergy Clin Immunol* 75(4): 496-500.
- Gershon, R. K. and K. Kondo (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." *Immunology* 18(5): 723-37.
- Gershon, R. K. and K. Kondo (1971). "Infectious immunological tolerance." *Immunology* 21(6): 903-14.
- Gillis, S., M. M. Ferm, W. Ou and K. A. Smith (1978). "T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity." *J Immunol* 120(6): 2027-32.
- Gleich, G. J., E. M. Zimmermann, L. L. Henderson and J. W. Yunginger (1982). "Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study." *J Allergy Clin Immunol* 70(4): 261-71.
- Gomez, G., S. Jogie-Brahim, M. Shima and L. B. Schwartz (2007). "Omalizumab reverses the phenotypic and functional effects of IgE-enhanced Fc epsilonRI on human skin mast cells." *J Immunol* 179(2): 1353-61.

- Gorelik, L., S. Constant and R. A. Flavell (2002). "Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation." *J Exp Med* 195(11): 1499-505.
- Gorelik, L., P. E. Fields and R. A. Flavell (2000). "Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression." *J Immunol* 165(9): 4773-7.
- Grembiale, R. D., L. Camporota, S. Naty, C. M. Tranfa, R. Djukanovic and S. A. Marsico (2000). "Effects of specific immunotherapy in allergic rhinitic individuals with bronchial hyperresponsiveness." *Am J Respir Crit Care Med* 162(6): 2048-52.
- Gri, G., S. Piconese, B. Frossi, V. Manfredi, S. Merluzzi, C. Tripodo, A. Viola, S. Odom, J. Rivera, M. P. Colombo and C. E. Pucillo (2008). "CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction." *Immunity* 29(5): 771-81.
- Grindebacke, H., P. Larsson, K. Wing, S. Rak and A. Rudin (2009). "Specific immunotherapy to birch allergen does not enhance suppression of Th2 cells by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells during pollen season." *J Clin Immunol* 29(6): 752-60.
- Grindebacke, H., K. Wing, A. C. Andersson, E. Suri-Payer, S. Rak and A. Rudin (2004). "Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season." *Clin Exp Allergy* 34(9): 1364-72.
- Groux, H. (2001). "An overview of regulatory T cells." *Microbes Infect* 3(11): 883-9.
- Groux, H., M. Bigler, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1996). "Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells." *J Exp Med* 184(1): 19-29.
- Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." *Nature* 389(6652): 737-42.
- Hahn, H., Kaufmann, S.H.E., Schulz, T.F., Suerbaum, S. (2008). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Verlag.

- Halken, S., S. Lau and E. Valovirta (2008). "New visions in specific immunotherapy in children: an iPAC summary and future trends." *Pediatr Allergy Immunol* 19 Suppl 19: 60-70.
- Hansen, G., G. Berry, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (1999). "Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation." *J Clin Invest* 103(2): 175-83.
- Hart, T. K., M. N. Blackburn, M. Brigham-Burke, K. Dede, N. Al-Mahdi, P. Zia-Amirhosseini and R. M. Cook (2002). "Preclinical efficacy and safety of pascolizumab (SB 240683): a humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma." *Clin Exp Immunol* 130(1): 93-100.
- Hoffjan, S. and J. T. Epplen (2005). "The genetics of atopic dermatitis: recent findings and future options." *J Mol Med* 83(9): 682-92.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* 299(5609): 1057-61.
- Howarth, P. H. and K. Holmberg (1995). "Allergic rhinitis: an increasing clinical problem." *Allergy* 50(23 Suppl): 4-5.
- Huang, T. J., P. A. MacAry, P. Eynott, A. Moussavi, K. C. Daniel, P. W. Askenase, D. M. Kemeny and K. F. Chung (2001). "Allergen-specific Th1 cells counteract efferent Th2 cell-dependent bronchial hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation partly via IFN-gamma." *J Immunol* 166(1): 207-17.
- Huber, S. and C. Schramm (2006). "TGF-beta and CD4+CD25+ regulatory T cells." *Front Biosci* 11: 1014-23.
- Huber, S., C. Schramm, H. A. Lehr, A. Mann, S. Schmitt, C. Becker, M. Protschka, P. R. Galle, M. F. Neurath and M. Blessing (2004). "Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells." *J Immunol* 173(11): 6526-31.
- Huehn, J., J. K. Polansky and A. Hamann (2009). "Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?" *Nat Rev Immunol* 9(2): 83-9.

- Imada, M., F. E. Simons, F. T. Jay and K. T. Hayglass (1995). "Allergen-stimulated interleukin-4 and interferon-gamma production in primary culture: responses of subjects with allergic rhinitis and normal controls." *Immunology* 85(3): 373-80.
- Inal, A., D. U. Altintas, M. Yilmaz, G. B. Karakoc, S. G. Kendirli and Y. Sertdemir (2007). "Prevention of new sensitizations by specific immunotherapy in children with rhinitis and/or asthma monosensitized to house dust mite." *J Investig Allergol Clin Immunol* 17(2): 85-91.
- Ippoliti, F., W. De Santis, A. Volterrani, L. Lenti, N. Canitano, S. Lucarelli and T. Frediani (2003). "Immunomodulation during sublingual therapy in allergic children." *Pediatr Allergy Immunol* 14(3): 216-21.
- Jacobsen, L., B. Niggemann, S. Dreborg, H. A. Ferdousi, S. Halken, A. Host, A. Koivikko, L. A. Norberg, E. Valovirta, U. Wahn and C. Moller (2007). "Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study." *Allergy* 62(8): 943-8.
- Janeway, C. A. j. T., P.; Walporth, M.; Shlomchik, M.J. (2002). *Immunologie*. Berlin, Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
- Jarolim, E., H. Rumpold, A. T. Endler, H. Ebner, M. Breitenbach, O. Scheiner and D. Kraft (1989). "IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*." *Allergy* 44(6): 385-95.
- Jeannin, P., S. Lecoanet, Y. Delneste, J. F. Gauchat and J. Y. Bonnefoy (1998). "IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10." *J Immunol* 160(7): 3555-61.
- Johnstone, D. E. and A. Dutton (1968). "The value of hyposensitization therapy for bronchial asthma in children--a 14-year study." *Pediatrics* 42(5): 793-802.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop and A. H. Enk (2002). "Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells." *J Exp Med* 196(2): 255-60.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop and A. H. Enk (2001). "Identification and functional characterization of human

- CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." *J Exp Med* 193(11): 1285-94.
- Jutel, M., M. Akdis, F. Budak, C. Aebischer-Casaulta, M. Wrzyszcz, K. Blaser and C. A. Akdis (2003). "IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy." *Eur J Immunol* 33(5): 1205-14.
- Jutel, M., W. J. Pichler, D. Skrbic, A. Urwyler, C. Dahinden and U. R. Muller (1995). "Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures." *J Immunol* 154(8): 4187-94.
- Karlsson, M. R., J. Rugtveit and P. Brandtzaeg (2004). "Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy." *J Exp Med* 199(12): 1679-88.
- Kay, A. B. (2001). "Allergy and allergic diseases. First of two parts." *N Engl J Med* 344(1): 30-7.
- Keskin, O., A. Tuncer, G. Adalioglu, B. E. Sekerel, C. Sackesen and O. Kalayci (2006). "The effects of grass pollen allergoid immunotherapy on clinical and immunological parameters in children with allergic rhinitis." *Pediatr Allergy Immunol* 17(6): 396-407.
- Khattari, R., T. Cox, S. A. Yasayko and F. Ramsdell (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." *Nat Immunol* 4(4): 337-42.
- Khinchi, M. S., L. K. Poulsen, F. Carat, C. Andre, A. B. Hansen and H. J. Malling (2004). "Clinical efficacy of sublingual and subcutaneous birch pollen allergen-specific immunotherapy: a randomized, placebo-controlled, double-blind, double-dummy study." *Allergy* 59(1): 45-53.
- Kjellman, N. I. M. (1987). *Atopie Früherkennung und Prophylaxe*. Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag.
- Kleine-Tebbe, J. (2006). "A bright future for sublingual immunotherapy--contra." *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*(95): 242-50; discussion 250-2.
- Kleine-Tebbe, J., Bufer, A., Ebner, C., Eigenmann, P., Friedrichs, F., Fuchs, Th., Huttegger, I., Jung, K., Klimek, L., Kopp, M., et al. (2009). "Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen." *Allergo Journal* 18

- Korn, T., M. Oukka, V. Kuchroo and E. Bettelli (2007). "Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties." *Semin Immunol* 19(6): 362-71.
- Koski, G. K., K. Kariko, S. Xu, D. Weissman, P. A. Cohen and B. J. Czerniecki (2004). "Cutting edge: innate immune system discriminates between RNA containing bacterial versus eukaryotic structural features that prime for high-level IL-12 secretion by dendritic cells." *J Immunol* 172(7): 3989-93.
- Kracker, S. and A. Radbruch (2004). "Immunoglobulin class switching: in vitro induction and analysis." *Methods Mol Biol* 271: 149-59.
- Kuo, C. H., W. L. Wang, Y. T. Chu, M. S. Lee and C. H. Hung (2009). "Sublingual immunotherapy in children: an updated review." *Pediatr Neonatol* 50(2): 44-9.
- Kurz, H. and J. Riedler (2003). "[An increase in allergic diseases in childhood--current hypotheses and possible prevention]." *Wien Med Wochenschr* 153(3-4): 50-8.
- Larche, M., C. A. Akdis and R. Valenta (2006). "Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy." *Nat Rev Immunol* 6(10): 761-71.
- Larenas-Linnemann, D. (2009). "Sublingual immunotherapy in children: complete and updated review supporting evidence of effect." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9(2): 168-76.
- Lemanske, R. F. (2002). "The Childhood Origins of Asthma (COAST) study." *Pediatric Allergy and Immunology* 13: 38-43.
- Lessoof, M. H., A. K. Sobotka and L. M. Lichtenstein (1978). "Effects of passive antibody in bee venom anaphylaxis." *Johns Hopkins Med J* 142(1): 1-7.
- Letterio, J. J. and A. B. Roberts (1998). "Regulation of immune responses by TGF-beta." *Annu Rev Immunol* 16: 137-61.
- Lima, M. T., D. Wilson, L. Pitkin, A. Roberts, K. Nouri-Aria, M. Jacobson, S. Walker and S. Durham (2002). "Grass pollen sublingual immunotherapy for seasonal rhinoconjunctivitis: a randomized controlled trial." *Clin Exp Allergy* 32(4): 507-14.
- Linehan, M. F., T. L. Frank, M. L. Hazell, H. C. Francis, J. A. Morris, D. N. Baxter and R. M. Niven (2007). "Is the prevalence of wheeze in children altered by neonatal BCG vaccination?" *J Allergy Clin Immunol* 119(5): 1079-85.



- Ling, E. M., T. Smith, X. D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, V. A. Carr and D. S. Robinson (2004). "Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease." *Lancet* 363(9409): 608-15.
- Liston, A. and A. Y. Rudensky (2007). "Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells." *Curr Opin Immunol* 19(2): 176-85.
- Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler and J. A. Bluestone (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." *J Exp Med* 203(7): 1701-11.
- Lopes, J. E., T. R. Torgerson, L. A. Schubert, S. D. Anover, E. L. Ocheltree, H. D. Ochs and S. F. Ziegler (2006). "Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor." *J Immunol* 177(5): 3133-42.
- Los, H., P. E. Postmus and D. I. Boomsma (2001). "Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies." *Twin Res* 4(2): 81-93.
- Lue, K. H., Y. H. Lin, H. L. Sun, K. H. Lu, J. C. Hsieh and M. C. Chou (2006). "Clinical and immunologic effects of sublingual immunotherapy in asthmatic children sensitized to mites: a double-blind, randomized, placebo-controlled study." *Pediatr Allergy Immunol* 17(6): 408-15.
- Lundgren, M., U. Persson, P. Larsson, C. Magnusson, C. I. Smith, L. Hammarstrom and E. Severinson (1989). "Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells." *Eur J Immunol* 19(7): 1311-5.
- Macfarlane, A. J., O. M. Kon, S. J. Smith, K. Zeibecoglou, L. N. Khan, L. T. Barata, A. R. McEuen, M. G. Buckley, A. F. Walls, Q. Meng, M. Humbert, N. C. Barnes, D. S. Robinson, S. Ying and A. B. Kay (2000). "Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin." *J Allergy Clin Immunol* 105(1 Pt 1): 99-107.
- MacGlashan Jr, D. (2008). "IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils." *Current Opinion in Immunology* 20(6): 717-723.
- Mamessier, E., J. Birnbaum, P. Dupuy, D. Vervloet and A. Magnan (2006). "Ultra-rush venom immunotherapy induces differential T cell activation and

- regulatory patterns according to the severity of allergy." *Clin Exp Allergy* 36(6): 704-13.
- Marcucci, F., L. Sensi, G. Di Cara, C. Incorvaia and F. Frati (2005). "Dose dependence of immunological response to sublingual immunotherapy." *Allergy* 60(7): 952-6.
- Marcucci, F., L. Sensi, F. Frati, R. Bernardini, E. Novembre, A. Barbato and S. Pecora (2003). "Effects on inflammation parameters of a double-blind, placebo controlled one-year course of SLIT in children monosensitized to mites." *Allergy* 58(7): 657-62.
- Marie, J. C., J. J. Letterio, M. Gavin and A. Y. Rudensky (2005). "TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Exp Med* 201(7): 1061-7.
- McCutcheon, M., N. Wehner, A. Wensky, M. Kushner, S. Doan, L. Hsiao, P. Calabresi, T. Ha, T. V. Tran, K. M. Tate, J. Winkelhake and E. G. Spack (1997). "A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes." *J Immunol Methods* 210(2): 149-66.
- McHugh, S. M., J. Deighton, A. G. Stewart, P. J. Lachmann and P. W. Ewan (1995). "Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy." *Clin Exp Allergy* 25(9): 828-38.
- Medicines, C. o. t. S. o. (1986). CSM update: immunotherapy.
- Meiler, F., S. Klunker, M. Zimmermann, C. A. Akdis and M. Akdis (2008). "Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors." *Allergy* 63(11): 1455-63.
- Meiler, F., J. Zumkehr, S. Klunker, B. Ruckert, C. A. Akdis and M. Akdis (2008). "In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure." *J Exp Med* 205(12): 2887-98.
- Möbs, C. (2010b). Zelluläre Mechanismen der Toleranzinduktion unter spezifischer Immuntherapie mit inhalativen Allergenen. Marburg, Philipps-Universität Marburg.
- Möbs, C., C. Slotosch, H. Löffler, T. Jakob, M. Hertl and W. Pfutzner (2010a). "Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation." *J Immunol* 184(4): 2194-203.

- Moingeon, P., T. Batard, R. Fadel, F. Frati, J. Sieber and L. Van Overtvelt (2006). "Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy." *Allergy* 61(2): 151-65.
- Moll, I. (2005). *Dermatologie*, Georg Thieme Verlag KG.
- Moreno, C., J. Cuesta-Herranz, L. Fernandez-Tavora and E. Alvarez-Cuesta (2004). "Immunotherapy safety: a prospective multi-centric monitoring study of biologically standardized therapeutic vaccines for allergic diseases." *Clin Exp Allergy* 34(4): 527-31.
- Mortemousque, B., F. Bertel, J. De Casamayor, P. Verin and J. Colin (2003). "House-dust mite sublingual-swallow immunotherapy in perennial conjunctivitis: a double-blind, placebo-controlled study." *Clin Exp Allergy* 33(4): 464-9.
- Mosmann, T. R. and S. Sad (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." *Immunol Today* 17(3): 138-46.
- Mothes, N., M. Heinzkill, K. J. Drachenberg, W. R. Sperr, M. T. Krauth, Y. Majlesi, H. Semper, P. Valent, V. Niederberger, D. Kraft and R. Valenta (2003). "Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies." *Clin Exp Allergy* 33(9): 1198-208.
- Mothes, N. and R. Valenta (2004). "Biology of tree pollen allergens." *Curr Allergy Asthma Rep* 4(5): 384-90.
- Moverare, R., S. Rak and L. Elfman (1998). "Allergen-specific increase in interleukin (IL)-4 and IL-5 secretion from peripheral blood mononuclear cells during birch-pollen immunotherapy." *Allergy* 53(3): 275-81.
- Moverare, R., K. Westritschnig, M. Svensson, B. Hayek, M. Bende, G. Pauli, R. Sorva, T. Haahtela, R. Valenta and L. Elfman (2002). "Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six European populations revealed by recombinant allergens: an imprint of local sensitization." *Int Arch Allergy Immunol* 128(4): 325-35.
- Mullen, A. C., F. A. High, A. S. Hutchins, H. W. Lee, A. V. Villarino, D. M. Livingston, A. L. Kung, N. Cereb, T. P. Yao, S. Y. Yang and S. L. Reiner (2001). "Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection." *Science* 292(5523): 1907-10.

- Mungan, D., Z. Misirligil and L. Gurbuz (1999). "Comparison of the efficacy of subcutaneous and sublingual immunotherapy in mite-sensitive patients with rhinitis and asthma--a placebo controlled study." *Ann Allergy Asthma Immunol* 82(5): 485-90.
- Naclerio, R. M., D. Proud, B. Moylan, S. Balcer, L. Freidhoff, A. Kagey-Sobotka, L. M. Lichtenstein, P. S. Creticos, R. G. Hamilton and P. S. Norman (1997). "Clinical aspects of allergic disease: A double-blind study of the discontinuation of ragweed immunotherapy." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 100(3): 293-300.
- Nakamura, K., A. Kitani and W. Strober (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta." *J Exp Med* 194(5): 629-44.
- Nelson, H. S. (2004). "Advances in upper airway diseases and allergen immunotherapy." *J Allergy Clin Immunol* 113(4): 635-42.
- Ng, W. F., P. J. Duggan, F. Ponchel, G. Matarese, G. Lombardi, A. D. Edwards, J. D. Isaacs and R. I. Lechler (2001). "Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells." *Blood* 98(9): 2736-44.
- Niederberger, V., G. Pauli, H. Gronlund, R. Froschl, H. Rumpold, D. Kraft, R. Valenta and S. Spitzauer (1998). "Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel, and oak pollen: a quantitative IgE inhibition study with sera from different populations." *J Allergy Clin Immunol* 102(4 Pt 1): 579-91.
- Nies, J. H., C. Bar, G. Schlenvoigt, B. Fahlbusch, G. Zwacka and U. R. Markert (2002). "IL-4 supplemented B-cell cultures of allergic children show reduced IgA and IgG production in response to additional stimulation with IL-10." *J Invest Allergol Clin Immunol* 12(2): 99-106.
- Niu, C. K., W. Y. Chen, J. L. Huang, K. H. Lue and J. Y. Wang (2006). "Efficacy of sublingual immunotherapy with high-dose mite extracts in asthma: a multi-center, double-blind, randomized, and placebo-controlled study in Taiwan." *Respir Med* 100(8): 1374-83.
- Nonaka, M., R. Pawankar, A. Fukumoto and T. Yagi (2008). "Heterogeneous response of nasal and lung fibroblasts to transforming growth factor-beta 1." *Clin Exp Allergy* 38(5): 812-21.

197. Noon, L. (1911). "Prophylactic inoculation against hay fever." *Lancet*.
- Nouri-Aria, K. T., P. A. Wachholz, J. N. Francis, M. R. Jacobson, S. M. Walker, L. K. Wilcock, S. Q. Staple, R. C. Aalberse, S. J. Till and S. R. Durham (2004). "Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity." *J Immunol* 172(5): 3252-9.
- Novembre, E., E. Galli, F. Landi, C. Caffarelli, M. Pifferi, E. De Marco, S. E. Burastero, G. Calori, L. Benetti, P. Bonazza, P. Puccinelli, S. Parmiani, R. Bernardini and A. Vierucci (2004). "Coseasonal sublingual immunotherapy reduces the development of asthma in children with allergic rhinoconjunctivitis." *J Allergy Clin Immunol* 114(4): 851-7.
- O'Brien, R. M., K. A. Byron, G. A. Varigos and W. R. Thomas (1997). "House dust mite immunotherapy results in a decrease in Der p 2-specific IFN-gamma and IL-4 expression by circulating T lymphocytes." *Clin Exp Allergy* 27(1): 46-51.
- Otsuka, H., A. Mezawa, M. Ohnishi, K. Okubo, H. Seki and M. Okuda (1991). "Changes in nasal metachromatic cells during allergen immunotherapy." *Clin Exp Allergy* 21(1): 115-9.
- Ozdemir, C., D. Yazı, I. Gocmen, O. Yesil, M. Aydogan, A. Semic-Jusufagic, N. N. Bahceciler and I. B. Barlan (2007). "Efficacy of long-term sublingual immunotherapy as an adjunct to pharmacotherapy in house dust mite-allergic children with asthma." *Pediatr Allergy Immunol* 18(6): 508-15.
- Pajno, G. B., L. Morabito, G. Barberio and S. Parmiani (2000). "Clinical and immunologic effects of long-term sublingual immunotherapy in asthmatic children sensitized to mites: a double-blind, placebo-controlled study." *Allergy* 55(9): 842-9.
- Palomares, O., G. Yaman, A. K. Azkur, T. Akkoc, M. Akdis and C. A. Akdis "Role of Treg in immune regulation of allergic diseases." *Eur J Immunol* 40(5): 1232-40.
- Palomares, O., G. Yaman, A. K. Azkur, T. Akkoc, M. Akdis and C. A. Akdis (2010). "Role of Treg in immune regulation of allergic diseases." *Eur J Immunol* 40(5): 1232-40.
- Parronchi, P., F. Brugnolo, F. Annunziato, C. Manuelli, S. Sampognaro, C. Mavilia, S. Romagnani and E. Maggi (1999). "Phosphorothioate

- oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors." *J Immunol* 163(11): 5946-53.
- Penagos, M., E. Compalati, F. Tarantini, R. Baena-Cagnani, J. Huerta, G. Passalacqua and G. W. Canonica (2006). "Efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis in pediatric patients 3 to 18 years of age: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled, double-blind trials." *Ann Allergy Asthma Immunol* 97(2): 141-8.
- Penagos, M., G. Passalacqua, E. Compalati, C. E. Baena-Cagnani, S. Orozco, A. Pedroza and G. W. Canonica (2008). "Metaanalysis of the efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic asthma in pediatric patients, 3 to 18 years of age." *Chest* 133(3): 599-609.
- Peng, Z. K., R. M. Naclerio, P. S. Norman and N. F. Adkinson, Jr. (1992). "Quantitative IgE- and IgG-subclass responses during and after long-term ragweed immunotherapy." *J Allergy Clin Immunol* 89(2): 519-29.
- Pfaar, O. and L. Klimek (2008). "Efficacy and safety of specific immunotherapy with a high-dose sublingual grass pollen preparation: a double-blind, placebo-controlled trial." *Ann Allergy Asthma Immunol* 100(3): 256-63.
- Piccirillo, C. A. and E. M. Shevach (2004). "Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance." *Semin Immunol* 16(2): 81-8.
- Pilette, C., S. R. Durham, J. P. Vaerman and Y. Sibille (2004). "Mucosal immunity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: a role for immunoglobulin A?" *Proc Am Thorac Soc* 1(2): 125-35.
- Pilette, C., K. T. Nouri-Aria, M. R. Jacobson, L. K. Wilcock, B. Detry, S. M. Walker, J. N. Francis and S. R. Durham (2007). "Grass pollen immunotherapy induces an allergen-specific IgA2 antibody response associated with mucosal TGF-beta expression." *J Immunol* 178(7): 4658-66.
- Pirquet, C. (1906). "Allergie." *Münchener Medizinische Wochenschrift* 30: 1457.
- Platts-Mills, T. A., R. K. von Maur, K. Ishizaka, P. S. Norman and L. M. Lichtenstein (1976). "IgA and IgG anti-ragweed antibodies in nasal secretions. Quantitative measurements of antibodies and correlation with inhibition of histamine release." *J Clin Invest* 57(4): 1041-50.
- Pozzan, M. and M. Milani (2010). "Efficacy of sublingual specific immunotherapy in patients with respiratory allergy to *Alternaria alternata*: a

- randomised, assessor-blinded, patient-reported outcome, controlled 3-year trial." *Curr Med Res Opin* 26(12): 2801-6.
- Pradalier, A., D. Basset, A. Claudel, P. Couturier, F. Wessel, S. Galvain and C. Andre (1999). "Sublingual-swallow immunotherapy (SLIT) with a standardized five-grass-pollen extract (drops and sublingual tablets) versus placebo in seasonal rhinitis." *Allergy* 54(8): 819-28.
- Punnonen, J., R. de Waal Malefyt, P. van Vlasselaer, J. F. Gauchat and J. E. de Vries (1993). "IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes." *J Immunol* 151(3): 1280-9.
- Purello-D'Ambrosio, F., S. Gangemi, R. A. Merendino, S. Isola, P. Puccinelli, S. Parmiani and L. Ricciardi (2001). "Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study." *Clin Exp Allergy* 31(8): 1295-302.
- Quirino, T., E. Iemoli, E. Siciliani, S. Parmiani and F. Milazzo (1996). "Sublingual versus injective immunotherapy in grass pollen allergic patients: a double blind (double dummy) study." *Clin Exp Allergy* 26(11): 1253-61.
- Radbruch, A., G. Muehlinghaus, E. O. Luger, A. Inamine, K. G. Smith, T. Dorner and F. Hiepe (2006). "Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell." *Nat Rev Immunol* 6(10): 741-50.
- Radulovic, S., M. R. Jacobson, S. R. Durham and K. T. Nouri-Aria (2008). "Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells in the nasal mucosa." *J Allergy Clin Immunol* 121(6): 1467-72, 1472 e1.
- Rak, S., O. Lowhagen and P. Venge (1988). "The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients." *J Allergy Clin Immunol* 82(3 Pt 1): 470-80.
- Reisinger, J., F. Horak, G. Pauli, M. van Hage, O. Cromwell, F. Konig, R. Valenta and V. Niederberger (2005). "Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity." *J Allergy Clin Immunol* 116(2): 347-54.
- Ridolo, E., R. Albertini, D. Giordano, L. Soliani, I. Usberti and P. P. Dall'Aglio (2007). "Airborne pollen concentrations and the incidence of allergic asthma

- and rhinoconjunctivitis in northern Italy from 1992 to 2003." *Int Arch Allergy Immunol* 142(2): 151-7.
- Riedler, J., C. Braun-Fahrlander, W. Eder, M. Schreuer, M. Waser, S. Maisch, D. Carr, R. Schierl, D. Nowak and E. von Mutius (2001). "Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey." *Lancet* 358(9288): 1129-33.
- Rincon, M., J. Anguita, T. Nakamura, E. Fikrig and R. A. Flavell (1997). "Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells." *J Exp Med* 185(3): 461-9.
- Ring, J. (1995). *Angewandte Allergologie*. München, MMV/Urban Vogel.
- Ring, J. B., C ; Bauer, C. P.; Czech, W (2009). *Weißbuch Allergie in Deutschland*, Urban + Vogel GmbH.
- Ring, S., S. C. Schafer, K. Mahnke, H. A. Lehr and A. H. Enk (2006). "CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue." *Eur J Immunol* 36(11): 2981-92.
- Robinson, D. S., Q. Hamid, S. Ying, A. Tsicopoulos, J. Barkans, A. M. Bentley, C. Corrigan, S. R. Durham and A. B. Kay (1992). "Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma." *N Engl J Med* 326(5): 298-304.
- Rodriguez, J., J. F. Crespo, A. Lopez-Rubio, J. De La Cruz-Bertolo, P. Ferrando-Vivas, R. Vives and P. Daroca (2000). "Clinical cross-reactivity among foods of the Rosaceae family." *J Allergy Clin Immunol* 106(1 Pt 1): 183-9.
- Romagnani, S. (1994). "Lymphokine production by human T cells in disease states." *Annu Rev Immunol* 12: 227-57.
- Romagnani, S. (2000). "T-cell subsets (Th1 versus Th2)." *Ann Allergy Asthma Immunol* 85(1): 9-18; quiz 18, 21.
- Romagnani, S. (2006). "Regulation of the T cell response." *Clin Exp Allergy* 36(11): 1357-66.
- Romagnani, S. (2006). "Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders?" *Allergy* 61(1): 3-14.



- Romagnani, S. (2007). "Coming back to a missing immune deviation as the main explanatory mechanism for the hygiene hypothesis." *J Allergy Clin Immunol* 119(6): 1511-3.
- Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer and M. K. Levings (2006). "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans." *Immunol Rev* 212: 28-50.
- Rossi, R. E., G. Monasterolo, G. Coco, L. Silvestro and D. Operti (2007). "Evaluation of serum IgG4 antibodies specific to grass pollen allergen components in the follow up of allergic patients undergoing subcutaneous and sublingual immunotherapy." *Vaccine* 25(5): 957-64.
- Rouse, B. T. (2007). "Regulatory T cells in health and disease." *J Intern Med* 262(1): 78-95.
- Royer, B., S. Varadaradjalou, P. Saas, J. J. Guillosson, J. P. Kantelip and M. Arock (2001). "Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10." *Clin Exp Allergy* 31(5): 694-704.
- Sakaguchi, S. (2003). "Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express toll-like receptors." *J Exp Med* 197(4): 397-401.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* 155(3): 1151-64.
- Sakaguchi, S., K. Wing and T. Yamaguchi (2009). "Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg." *Eur J Immunol* 39(9): 2331-6.
- Santeliz, J. V., G. Van Nest, P. Traquina, E. Larsen and M. Wills-Karp (2002). "Amb a 1-linked CpG oligodeoxynucleotides reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma." *J Allergy Clin Immunol* 109(3): 455-62.
- Sanz, M. L., I. Prieto, B. E. Garcia and A. Oehling (1996). "Diagnostic reliability considerations of specific IgE determination." *J Investig Allergol Clin Immunol* 6(3): 152-61.

- Satoguina, J. S., T. Adjobimey, K. Arndts, J. Hoch, J. Oldenburg, L. E. Layland and A. Hoerauf (2008). "Tr1 and naturally occurring regulatory T cells induce IgG4 in B cells through GITR/GITR-L interaction, IL-10 and TGF-beta." *Eur J Immunol* 38(11): 3101-13.
- Savolainen, J., L. Jacobsen and E. Valovirta (2006). "Sublingual immunotherapy in children modulates allergen-induced in vitro expression of cytokine mRNA in PBMC." *Allergy* 61(10): 1184-90.
- Scadding, G. and S. Durham (2009). "Mechanisms of sublingual immunotherapy." *J Asthma* 46(4): 322-34.
- Scadding, G. K. and J. Brostoff (1986). "Low dose sublingual therapy in patients with allergic rhinitis due to house dust mite." *Clin Allergy* 16(5): 483-91.
- Scadding, G. W., M. H. Shamji, M. R. Jacobson, D. I. Lee, D. Wilson, M. T. Lima, L. Pitkin, C. Pilette, K. Nouri-Aria and S. R. Durham (2010). "Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells." *Clin Exp Allergy* 40(4): 598-606.
- Schmidt-Weber, C. B. and K. Blaser (2004). "Regulation and role of transforming growth factor-[beta] in immune tolerance induction and inflammation." *Current Opinion in Immunology* 16(6): 709-716.
- Schmidt-Weber, C. B. and K. Blaser (2006). "Immunological mechanisms of specific allergen immunotherapy." *Inflamm Allergy Drug Targets* 5(1): 15-21.
- Schwartz, R. H. (2003). "T cell anergy." *Annu Rev Immunol* 21: 305-34.
- Secrist, H., C. J. Chelen, Y. Wen, J. D. Marshall and D. T. Umetsu (1993). "Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals." *J Exp Med* 178(6): 2123-30.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher and B. Fazekas de St Groth (2006). "Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells." *J Exp Med* 203(7): 1693-700.

- Sehmi, R., A. J. Wardlaw, O. Cromwell, K. Kurihara, P. Walzmann and A. B. Kay (1992). "Interleukin-5 selectively enhances the chemotactic response of eosinophils obtained from normal but not eosinophilic subjects." *Blood* 79(11): 2952-9.
- Shreffler, W. G., N. Wanich, M. Moloney, A. Nowak-Wegrzyn and H. A. Sampson (2009). "Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein." *J Allergy Clin Immunol* 123(1): 43-52 e7.
- Smith, P. O., D.R.; Adkinson, N.; Bochner, B.S. ; Busse, W.W.; Holgate, S.T.; Lemanske, R.F.; Simons, F.E.R. (2009). *Middleton's allergy: principles and practice* St Louis, Mosby Elsevier.
- Soroosh, P. and T. A. Doherty (2009). "Th9 and allergic disease." *Immunology* 127(4): 450-8.
- Stadler, F., H. Iro, J. A. Werner and L. Klimek (2009). *Allergologie. Handbuch HNO 2009*, Springer Berlin Heidelberg: 287-309.
- Stassen, M., H. Jonuleit, C. Muller, M. Klein, C. Richter, T. Bopp, S. Schmitt and E. Schmitt (2004). "Differential regulatory capacity of CD25+ T regulatory cells and preactivated CD25+ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells." *J Immunol* 173(1): 267-74.
- Stokes, C. R., B. Taylor and M. W. Turner (1974). "Association of house-dust and grass-pollen allergies with specific IgA antibody deficiency." *Lancet* 2(7879): 485-8.
- Stone, K. D., C. Prussin and D. D. Metcalfe (2010). "IgE, mast cells, basophils, and eosinophils." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2, Supplement 2): S73-S80.
- Strachan, D., B. Sibbald, S. Weiland, N. Ait-Khaled, G. Anabwani, H. R. Anderson, M. I. Asher, R. Beasley, B. Bjorksten, M. Burr, T. Clayton, J. Crane, P. Ellwood, U. Keil, C. Lai, J. Mallol, F. Martinez, E. Mitchell, S. Montefort, N. Pearce, C. Robertson, J. Shah, A. Stewart, E. von Mutius and H. Williams (1997). "Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)." *Pediatr Allergy Immunol* 8(4): 161-76.

- Strachan, D. P. (1989). "Hay fever, hygiene, and household size." *BMJ* 299(6710): 1259-60.
- Strachan, D. P. (1997). "Allergy and family size: a riddle worth solving." *Clin Exp Allergy* 27(3): 235-6.
- Strait, R. T., S. C. Morris and F. D. Finkelman (2006). "IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIb cross-linking." *J Clin Invest* 116(3): 833-41.
- Strutz, J. M., W. (2001). *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie*. Stuttgart, Thieme.
- Sun, J. B., C. F. Flach, C. Czerkinsky and J. Holmgren (2008). "B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit." *J Immunol* 181(12): 8278-87.
- Sutterwala, F. S., G. J. Noel, P. Salgame and D. M. Mosser (1998). "Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc gamma receptor type I." *J Exp Med* 188(1): 217-22.
- Svenson, M., H. H. Jacobi, U. Bodtger, L. K. Poulsen, K. Rieneck and K. Bendtzen (2003). "Vaccination for birch pollen allergy. Induction of affinity-matured or blocking IgG antibodies does not account for the reduced binding of IgE to Bet v 1." *Mol Immunol* 39(10): 603-12.
- Taams, L. S., D. B. Palmer, A. N. Akbar, D. S. Robinson, Z. Brown and C. M. Hawrylowicz (2006). "Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation." *Immunology* 118(1): 1-9.
- Tadokoro, C. E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille and M. L. Dustin (2006). "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo." *J Exp Med* 203(3): 505-11.
- Tang, Q., K. J. Henriksen, E. K. Boden, A. J. Tooley, J. Ye, S. K. Subudhi, X. X. Zheng, T. B. Strom and J. A. Bluestone (2003). "Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* 171(7): 3348-52.
- Tantisira, K. G., E. S. Silverman, T. J. Mariani, J. Xu, B. G. Richter, B. J. Klanderman, A. A. Litonjua, R. Lazarus, L. J. Rosenwasser, A. L. Fuhlbrigge and S. T. Weiss (2007). "FCER2: A pharmacogenetic basis for severe

- exacerbations in children with asthma." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120(6): 1285-1291.
- Tari, M. G., M. Mancino, F. Madonna, L. Buzzoni and S. Parmiani (1994). "Immunologic evaluation of 24 month course of sublingual immunotherapy." *Allergol Immunopathol (Madr)* 22(5): 209-16.
- Taudorf, E. (1992). "Oral immunotherapy of adults with allergic rhinoconjunctivitis. Clinical effects in birch and grass pollinosis." *Dan Med Bull* 39(6): 542-60.
- Taylor, B., A. P. Norman, H. A. Orgel, C. R. Stokes, M. W. Turner and J. F. Soothill (1973). "Transient IgA deficiency and pathogenesis of infantile atopy." *Lancet* 2(7821): 111-3.
- Teixeira, L. K., B. P. Fonseca, B. A. Barboza and J. P. Viola (2005). "The role of interferon-gamma on immune and allergic responses." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1: 137-44.
- Thunberg, S., M. Akdis, C. A. Akdis, R. Gronneberg, V. Malmstrom, C. Trollmo, M. van Hage and G. Gafvelin (2007). "Immune regulation by CD4+CD25+ T cells and interleukin-10 in birch pollen-allergic patients and non-allergic controls." *Clin Exp Allergy* 37(8): 1127-36.
- Trautmann, A., M. Akdis, D. Kleemann, F. Altnauer, H. U. Simon, T. Graeve, M. Noll, E. B. Brocker, K. Blaser and C. A. Akdis (2000). "T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis." *J Clin Invest* 106(1): 25-35.
- Tseng, S. H., L. S. Fu, B. R. Nong, J. D. Weng and S. D. Shyur (2008). "Changes in serum specific IgG4 and IgG4/ IgE ratio in mite-sensitized Taiwanese children with allergic rhinitis receiving short-term sublingual-swallow immunotherapy: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial." *Asian Pac J Allergy Immunol* 26(2-3): 105-12.
- Turcanu, V., S. J. Maleki and G. Lack (2003). "Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts." *J Clin Invest* 111(7): 1065-72.
- Valenta, R. (2002). "The future of antigen-specific immunotherapy of allergy." *Nat Rev Immunol* 2(6): 446-53.

- Valenta, R. and V. Niederberger (2007). "Recombinant allergens for immunotherapy." *J Allergy Clin Immunol* 119(4): 826-30.
- Valovirta, E., L. Jacobsen, C. Ljorring, A. Koivikko and J. Savolainen (2006). "Clinical efficacy and safety of sublingual immunotherapy with tree pollen extract in children." *Allergy* 61(10): 1177-83.
- van Neerven, R. J., M. Arvidsson, H. Ipsen, S. H. Sparholt, S. Rak and P. A. Wurtzen (2004). "A double-blind, placebo-controlled birch allergy vaccination study: inhibition of CD23-mediated serum-immunoglobulin E-facilitated allergen presentation." *Clin Exp Allergy* 34(3): 420-8.
- van Neerven, R. J., T. Wikborg, G. Lund, B. Jacobsen, A. Brinch-Nielsen, J. Arnved and H. Ipsen (1999). "Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation." *J Immunol* 163(5): 2944-52.
- Van Overtvelt, L., E. Wambre, B. Maillere, E. von Hofe, A. Louise, A. M. Balazuc, B. Bohle, D. Ebo, C. Leboulaire, G. Garcia and P. Moingeon (2008). "Assessment of Bet v 1-specific CD4+ T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers." *J Immunol* 180(7): 4514-22.
- Van Ree, R., W. A. Van Leeuwen, P. H. Dieges, R. G. Van Wijk, N. De Jong, P. Z. Brewczynski, A. M. Kroon, P. P. Schilte, K. Y. Tan, I. F. Simon-Licht, A. M. Roberts, S. O. Stapel and R. C. Aalberse (1997). "Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy." *Clin Exp Allergy* 27(1): 68-74.
- Vandenbark, A. A., D. Barnes, T. Finn, D. N. Bourdette, R. Whitham, I. Robey, J. Kaleeba, B. F. Bebo, Jr., S. D. Miller, H. Offner and Y. K. Chou (2000). "Differential susceptibility of human T(h)1 versus T(h) 2 cells to induction of anergy and apoptosis by ECDI/antigen-coupled antigen-presenting cells." *Int Immunol* 12(1): 57-66.
- Varney, V. A., J. Edwards, K. Tabbah, H. Brewster, G. Mavroleon and A. J. Frew (1997). "Clinical efficacy of specific immunotherapy to cat dander: a double-blind placebo-controlled trial." *Clin Exp Allergy* 27(8): 860-7.
- Varney, V. A., Q. A. Hamid, M. Gaga, S. Ying, M. Jacobson, A. J. Frew, A. B. Kay and S. R. Durham (1993). "Influence of grass pollen immunotherapy on

- cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses." *J Clin Invest* 92(2): 644-51.
- Venkataraman, C., S. Leung, A. Salvekar, H. Mano and U. Schindler (1999). "Repression of IL-4-induced gene expression by IFN-gamma requires Stat1 activation." *J Immunol* 162(7): 4053-61.
- Vieira, P. L., J. R. Christensen, S. Minaee, E. J. O'Neill, F. J. Barrat, A. Boonstra, T. Barthlott, B. Stockinger, D. C. Wraith and A. O'Garra (2004). "IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* 172(10): 5986-93.
- Visco, V., C. Dolecek, S. Denepoux, J. Le Mao, C. Guret, F. Rousset, M. T. Guinnepain, D. Kraft, R. Valenta, A. Weyer, J. Banchereau and S. Labecque (1996). "Human IgG monoclonal antibodies that modulate the binding of specific IgE to birch pollen Bet v 1." *J Immunol* 157(2): 956-62.
- Vukmanovic-Stejic, M., Y. Zhang, J. E. Cook, J. M. Fletcher, A. McQuaid, J. E. Masters, M. H. Rustin, L. S. Taams, P. C. Beverley, D. C. Macallan and A. N. Akbar (2006). "Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo." *J Clin Invest* 116(9): 2423-33.
- Wachholz, P. A. and S. R. Durham (2004). "Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4(4): 313-8.
- Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breittmayer, F. Cottrez and H. Groux (2003). "Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo." *Immunity* 18(5): 605-17.
- Walker, S. M., G. B. Pajno, M. T. Lima, D. R. Wilson and S. R. Durham (2001). "Grass pollen immunotherapy for seasonal rhinitis and asthma: a randomized, controlled trial." *J Allergy Clin Immunol* 107(1): 87-93.
- Walker, S. M., V. A. Varney, M. Gaga, M. R. Jacobson and S. R. Durham (1995). "Grass pollen immunotherapy: efficacy and safety during a 4-year follow-up study." *Allergy* 50(5): 405-13.
- Wang, J., C. M. Visness, A. Calatroni, P. J. Gergen, H. E. Mitchell and H. A. Sampson (2009). "Effect of environmental allergen sensitization on asthma morbidity in inner-city asthmatic children." *Clinical & Experimental Allergy* 39(9): 1381-1389.

- Wang, P., P. Wu, M. I. Siegel, R. W. Egan and M. M. Billah (1994). "IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells." *J Immunol* 153(2): 811-6.
- Weiner, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." *Immunol Rev* 182: 207-14.
- Wetterwald, A., F. Skvaril, U. Muller and K. Blaser (1985). "Isotypic and idiotypic characterization of anti-bee venom phospholipase A2 antibodies." *Int Arch Allergy Appl Immunol* 77(1-2): 195-7.
- Wiesch, D. G., D. A. Meyers and E. R. Bleecker (1999). "Genetics of asthma." *J Allergy Clin Immunol* 104(5): 895-901.
- Wilson, D. R., A. M. Irani, S. M. Walker, M. R. Jacobson, I. S. Mackay, L. B. Schwartz and S. R. Durham (2001). "Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium." *Clin Exp Allergy* 31(11): 1705-13.
- Wilson, D. R., M. T. Lima and S. R. Durham (2005). "Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis." *Allergy* 60(1): 4-12.
- Wilson, D. R., K. T. Nouri-Aria, S. M. Walker, G. B. Pajno, F. O'Brien, M. R. Jacobson, I. S. Mackay and S. R. Durham (2001). "Grass pollen immunotherapy: symptomatic improvement correlates with reductions in eosinophils and IL-5 mRNA expression in the nasal mucosa during the pollen season." *J Allergy Clin Immunol* 107(6): 971-6.
- Wilson, D. R., L. I. Torres and S. R. Durham (2003). "Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis." *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD002893.
- Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura and S. Sakaguchi (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." *Science* 322(5899): 271-5.
- Wolf, H. M., E. Vogel, M. B. Fischer, H. Rengs, H. P. Schwarz and M. M. Eibl (1994). "Inhibition of receptor-dependent and receptor-independent generation of the respiratory burst in human neutrophils and monocytes by human serum IgA." *Pediatr Res* 36(2): 235-43.



- Wong, C. K., C. Y. Ho, F. W. Ko, C. H. Chan, A. S. Ho, D. S. Hui and C. W. Lam (2001). "Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma." *Clin Exp Immunol* 125(2): 177-83.
- Wood, K. J. and S. Sakaguchi (2003). "Regulatory T cells in transplantation tolerance." *Nat Rev Immunol* 3(3): 199-210.
- Woof, J. M. and J. Mestecky (2005). "Mucosal immunoglobulins." *Immunol Rev* 206: 64-82.
- Wu, K., Y. Bi, K. Sun and C. Wang (2007). "IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy." *Cell Mol Immunol* 4(4): 269-75.
- Wurtzen, P. A., L. Lund, G. Lund, J. Holm, A. Millner and H. Henmar (2007). "Chemical modification of birch allergen extract leads to a reduction in allergenicity as well as immunogenicity." *Int Arch Allergy Immunol* 144(4): 287-95.
- Xiao, C., H. Li, Z. Cheng, J. Qin, W. Zhou, Q. He and X. Xu (2010). "[The effect of specific immunotherapy on the regulation of Th1/Th2 cell ratio of the patients with allergic rhinitis in serum]." *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 24(20): 924-7.
- Ying, S., Q. Meng, L. T. Barata, D. S. Robinson, S. R. Durham and A. B. Kay (1997). "Associations between IL-13 and IL-4 (mRNA and protein), vascular cell adhesion molecule-1 expression, and the infiltration of eosinophils, macrophages, and T cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects." *J Immunol* 158(10): 5050-7.

## 8. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. M. Hertl danke ich herzlich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und das entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn PD. Dr. W. Pfützner danke ich für die fachlichen Verbesserungsvorschläge und Diskussionsanregungen für diese Arbeit.

Ich danke Dr. Christian Möbs, der mich in das wissenschaftliche Arbeiten im Labor eingeführt und beaufsichtigt, mich beim Verfassen meiner Arbeit kräftig unterstützt hat und bei Problemen oder Fragen immer ansprechbar und hilfsbereit war. Auf diese Weise hat er einen großen Teil zu dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch meiner Kollegin Britta Höbel für die kollegiale gemeinsame Arbeit innerhalb und außerhalb des Labors.

Vielen Dank an die ärztlichen und technischen Mitarbeiter der Allergologieabteilung der Hautklinik Marburg, die für die Patientenrekrutierung, die Blutentnahmen und die Erhebung der klinischen Parameter im Rahmen dieser Studie zuständig waren. Insbesondere danke ich Frau Wagenknecht und Frau Weimer für die gute Betreuung und reibungslose Zusammenarbeit. Frau Happel danke ich für die Auswertung der Serumproben und die Bestimmung der allergenspezifischen Antikörper.

Ein besonderer Dank gilt den Patienten der Hautklinik, die sich bereiterklärt haben an dieser Studie teilzunehmen und somit die Entstehung dieser Arbeit möglich gemacht haben.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Dermatologischen Forschungsabteilung des BMFZ für die geduldige Hilfe bei der Beantwortung von Fragen und der guten Zusammenarbeit.

Letztendlich danke ich meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung in guten als auch in schlechten Tagen und meinen Freunden für geduldige Gespräche und das Vertrauen in mich. Ein besonderer Dank geht an die, die besonders viel Zeit und Motivationsarbeit in mich investierten (Danke Anne, ohne dich wären die letzten sieben Jahre nicht denkbar gewesen; Danke Eike, du bist das beste, was mir je passiert ist.)

---

## 9. CURRICULUM VITAE

---

### Persönliche Daten

---

#### Karolin Ruge

**Geburtsdatum:** 01. April. 1985  
**Geburtsort:** Weimar  
**Nationalität:** deutsch  
**Familienstand:** ledig

---

### Hochschulstudium

---

10' 2004- 11' 2010	Philipps-Universität Marburg, Studium der Humanmedizin
08' 2006	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: gut)
08' 2009- 07' 2010	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Marburg
	Wahlfach: Neurologie
12' 2009-03' 1020	Auslandstertial: Spital Männedorf (Universität Zürich) Chirurgie
03' -05' 2010	Auslandstertial: Royal Prince Alfred Hospital (University of Sydney) Innere Medizin
11' 2010	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: gut)

---

### Berufliche Nebentätigkeiten

---

10' 2007-07' 2009	Studentische Hilfskraft der Viszeralchirurgie (Naht- und Knotenkurs)
07' 2007-01' 2010	Studentische Hilfskraft der Pneumologie (Schlaflabor)

---

### Sprachkenntnisse

---

Englisch	fließend in Schrift und Sprache
Französisch	Basiskenntnisse

---

### Schulbildung

---

1990 - 1995	Grundschule Berlin Friedrichshain
1995 – 1999	Gymnasium Berlin Friedrichshain
1999 – 2004	Gymnasium Brandenburg
07' 2004	allgemeine Hochschulreife (Gesamtnote: 1,5)

## **10. ANHANG**

### **Ehrenwörtliche Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Dissertation**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Zelluläre Mechanismen der Toleranzinduktion unter spezifischer sublingualer Immuntherapie mit Birkenpollenallergenen" im Institut/ in der Klinik für Dermatologie und Allergologie unter Leitung von PD Dr. Wolfgang Pfützner mit Unterstützung durch Dr. Christian Möbs ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 27.03.2011

---

Unterschrift

---

## **Verzeichnis akademischer Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Professoren, Doktoren und Dozenten

In Marburg:

Aigner, Arnold, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker, Behr, Berger, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Fuchs-Winkelmann, Gress, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Kann, Klenk, Klose, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhn, Lill, Löffler, Lohoff, Lorenz, Maisch, Maier, Mandrek, Martin, Meier, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Ramaswamy, Rausch, Renz, Richter, Riße, Röhm, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Seitz, Steiniger, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Wulf, Zovko.

## Patientendaten

### Birkenpollen-spezifisches IgE [kUA/l]

	M0	M1	M3	M6	M12
P1	24,8	26,3	38,2	45,1	21,8
P2	24	24,4	97,7	64,7	38,55
P3	24,1	21,3	57	41	22,7
P4	50,4	63,8	100	100	100
P5	27,7	34,4	61,9	53,3	40
P6	3,89	4,43	5,3	8,35	10,1

### Bet v 1-spezifisches IgE [kUA/l]

	M0	M1	M3	M6	M12
P1	35,1	37	53,9	40,5	18,1
P2	34	59,9	100	100	33,5
P3	30	40,4	40	42,1	15,6
P4	67,1	100	100	100	100
P5	43,1	81,5	87,7	77,9	31,8
P6	2,81	3,22	5,61	11,1	12,3

**Gesamt-IgE [kU/l]**

	M0	M1	M3	M6	M12
P1	345	279	304	238	278
P2	47,2	79	148	102	36,8
P3	133	133	84,4	131	138
P4	269	358	434	447	431
P5	88,2	125	139	132	55,5
P6	27,5	55	43,2	42,7	45,8

**Birkenpollen-spezifisches IgG4 [mgA/l]**

	M0	M1	M3	M6	M12
P1	0,31	0,25	0,07	1,07	0,29
P2	0,32	0,26	0,01	0,76	0,88
P3	0,3	0,25	0,43	0,55	0,54
P4	1,97	1,8	2,56	3,02	1,69
P5	0,04	0,42	0,43	0,62	0,01
P6	0,43	0,33	0,36	0,38	0,28



**Verhältnis Birkenpollen-spezifisches IgE/IgG4**

	M0	M1	M3	M6	M12
P1	113,23	148	770	37,85	62,41
P2	106,25	230,38	10000	131,58	38,07
P3	443,33	532	196,28	238,18	255,56
P4	34,06	55,56	39,06	33,11	59,17
P5	1077,5	194,05	203,95	125,65	3180
P6	6,53	9,76	15,58	29,21	43,93

**IL-5<sup>+</sup> spots/200.000 PBMC**

	M0	M1	M3	M6	M12
P1	11	0	8	0	0
P2	37	28	24	4	2
P3	6	2	1	15	0
P4	5	26	41	28	50
P5	25	26	16	10	19
P6	10	0	98	17	83

**IL-10<sup>+</sup> spots/200.000 PBMC**

	M0	M1	M3	M6	M12
P1	8	0	2	0	2
P2	0	2	8	0	3
P3	0	10	5	0	2
P4	21	3	2	0	10
P5	0	0	5	5	2
P6	9	4	23	0	0

**IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> spots/200.000 PBMC**

	M0	M1	M3	M6	M12
P1	0	0	0	27	0
P2	0	23	0	0	8
P3	62	0	0	0	20
P4	0	71	1	23	27
P5	6	0	3	0	14
P6	0	0	0	0	0

**CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Treg [% aller CD4<sup>+</sup>-Zellen]**

	M0	M1	M3	M6	M12
P1	2,26	2,38	2,87	1,60	2,74
P2	1,05	0,92	1,13	1,38	1,04
P3	1,90	1,62	1,92	1,89	2,02
P4	0,97	0,42		0,01	0,91
P5	2,56	2,85	1,23	8,33	5,43
P6	1,33	1,88	1,59	0,49	1,69

**P1**

	M0	M1	M3	M6	M12
IL-5 <sup>+</sup> spots/200.000 PBMC	11	0	8	0	0
IL-10 <sup>+</sup> spots/200.000 PBMC	8	0	2	0	2
IFN-γ <sup>+</sup> spots/200.000 PBMC	0	0	0	27	0
Bet v 1-spezifisches IgE [kUA/l]	35,1	37	53,9	40,5	18,1
Gesamt-IgE [kU/l]	345	279	304	238	278
Birkenpollen-spezifisches IgG4 [mgA/l]	0,31	0,25	0,07	1,07	0,29
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> Treg [% aller CD4 <sup>+</sup> -Zellen]	2,26	2,38	2,87	1,60	2,74

**P2**

	M0	M1	M3	M6	M12
IL-5 <sup>+</sup> spots/200.000 PBMC	37	28	24	4	2
IL-10 <sup>+</sup> spots/200.000 PBMC	0	2	8	0	3
IFN-γ <sup>+</sup> spots/200.000 PBMC	0	23	0	0	8
Bet v 1-spezifisches IgE [kUA/l]	34	59,9	100	100	33,5
Gesamt-IgE [kU/l]	47,2	79	148	102	36,8
Birkenpollen-spezifisches IgG4 [mgA/l]	0,32	0,26	0,01	0,76	0,88
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> Treg [% aller CD4 <sup>+</sup> -Zellen]	1,05	0,92	1,138	1,38	1,04

**P3**

	M0	M1	M3	M6	M12
IL-5 <sup>+</sup> spots/200.000 PBMC	6	2	1	15	0
IL-10 <sup>+</sup> spots/200.000 PBMC	0	10	5	0	2
IFN-γ <sup>+</sup> spots/200.000 PBMC	62	0	0	0	20
Bet v 1-spezifisches IgE [kUA/l]	30	40,4	40	42,1	15,6
Gesamt-IgE [kU/l]	133	133	84,4	131	138
Birkenpollen-spezifisches IgG4 [mgA/l]	0,3	0,25	0,43	0,55	0,54
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> Treg [% aller CD4 <sup>+</sup> -Zellen]	1,90	1,62	1,92	1,89	2,02

**P4**

	M0	M1	M3	M6	M12
IL-5 <sup>+</sup> spots/200.000 PBMC	5	26	41	28	50
IL-10 <sup>+</sup> spots/200.000 PBMC	21	3	2	0	10
IFN-γ <sup>+</sup> spots/200.000 PBMC	0	71	1	23	27
Bet v 1-spezifisches IgE [kUA/l]	67,1	100	100	100	100
Gesamt-IgE [kU/l]	268	358	434	447	431
Birkenpollen-spezifisches IgG4 [mgA/l]	1,97	1,8	2,56	3,02	1,69
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> Treg [% aller CD4 <sup>+</sup> -Zellen]	0,97	0,42		0,01	0,91

**P5**

	M0	M1	M3	M6	M12
IL-5 <sup>+</sup> <i>spots</i> /200.000 PBMC	25	26	16	10	19
IL-10 <sup>+</sup> <i>spots</i> /200.000 PBMC	0	0	5	5	2
IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> <i>spots</i> /200.000 PBMC	6	0	3	0	14
Bet v 1-spezifisches IgE [kUA/l]	43,1	81,5	87,7	77,9	31,8
Gesamt-IgE [kU/l]	88,2	125	139	132	55,5
Birkenpollen-spezifisches IgG4 [mgA/l]	0,04	0,42	0,43	0,62	0,01
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> Treg [% aller CD4 <sup>+</sup> -Zellen]	2,56	2,85	1,23	8,33	5,43

**P6**

	M0	M1	M3	M6	M12
IL-5 <sup>+</sup> <i>spots</i> /200.000 PBMC	10	0	98	17	83
IL-10 <sup>+</sup> <i>spots</i> /200.000 PBMC	9	4	23	0	0
IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> <i>spots</i> /200.000 PBMC	0	0	0	0	0
Bet v 1-spezifisches IgE [kUA/l]	2,81	3,22	5,61	11,1	12,3
Gesamt-IgE [kU/l]	27,5	55	43,2	42,7	45,8
Birkenpollen-spezifisches IgG4 [mgA/l]	0,43	0,33	0,36	0,38	0,28
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> Treg [% aller CD4 <sup>+</sup> -Zellen]	1,33	1,88	1,59	0,49	1,69

